

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA**

**Y**

**TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

**CALENTAMIENTO EN PASO  
ÚNICO DE EMBRIONES BOVINOS  
PRODUCIDOS *IN VITRO*  
Y VITRIFICADOS**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Laura Vanesa Abón Escalona

**TUTORA**

Carmen Díez Monforte

**JUNIO 2012**

La Dra. Carmen Díez Monforte certifica que el trabajo presentado por Laura Vanesa Abón Escalona titulado “Calentamiento en paso único de embriones bovinos producidos *in vitro* y vitrificados” cumple las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster.

**VºBº**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Carmen Díez Monforte', with a large, stylized flourish above the name.

**Fdo. Carmen Díez Monforte**

**En Oviedo a 11 de Junio de 2012**

## INDICE

<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	5
<b>CRIOCONSERVACIÓN</b> .....	7
<b>MÉTODOS CRIOCONSERVACIÓN</b> .....	7
➤ <b>Método de equilibrio o congelación lenta</b> .....	8
Descongelación.....	11
Eficacia del método.....	12
➤ <b>Método de no equilibrio</b> .....	12
• <b>Vitrificación clásica en pajuela</b> .....	12
Calentamiento.....	14
Eficacia del método.....	14
• <b>Vitrificación ultrarrápida</b> .....	14
○ <i>OPS</i> .....	15
○ <i>Cryoloop</i> .....	15
○ <i>Cryotop</i> .....	15
○ <i>Fibreplug</i> .....	16
Calentamiento.....	16
Eficacia del método.....	17
<b>PARÁMETROS DE VIABILIDAD EMBRIONARIA EN BOVINO</b> .....	17
➤ <b>Supervivencia a la crioconservación</b> .....	18
➤ <b>Análisis de las poblaciones celulares</b> .....	18
<b><u>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</u></b> .....	20
<b><u>MATERIALES Y METODOLOGÍAS</u></b> .....	21
➤ <b>Producción de embriones <i>in vitro</i></b> .....	21
• <b>Maduración <i>in vitro</i> de los ovocitos</b> .....	21

• Fecundación <i>in vitro</i> .....	21
• Cultivo <i>in vitro</i> .....	23
➤ <b>Vitrificación</b> .....	<b>24</b>
➤ <b>Calentamiento</b> .....	<b>25</b>
➤ <b>Recuento celular</b> .....	<b>26</b>
• Tinción vital.....	26
➤ <b>Diseño Experimental</b> .....	<b>26</b>
➤ <b>Análisis estadístico</b> .....	<b>26</b>
<b><u>RESULTADOS</u></b> .....	<b>27</b>
<b><u>DISCUSIÓN</u></b> .....	<b>29</b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b> .....	<b>33</b>
<b><u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	<b>34</b>

## INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* (EPIV) se ha convertido en una de las biotecnologías reproductivas que ha alcanzado un mayor desarrollo durante los últimos 20 años. Actualmente multitud de laboratorios abordan la producción de embriones por medio de esta técnica, con diferentes objetivos

1. Investigación: permite conocer los eventos que rigen la maduración del ovocito, la fecundación y las primeras fases del desarrollo embrionario, aspectos metabólicos del embrión preimplantatorio y las interacciones que se establecen entre los gametos o entre en tracto reproductivo y el embrión (materno-embriónicas); además, el embrión bovino sirve como modelo experimental para otras especies (incluida la humana).
2. Mejora genética de la raza: para incrementar la productividad ganadera.
3. Comercio: producción de embriones a partir de progenitores de alto mérito genético, para intercambios nacionales e internacionales.

Para la producción de EPIV, los ovocitos se recuperan a partir de ovarios obtenidos en el matadero (*post-mortem*) o a partir de hembras vivas por punción transvaginal guiada ecográficamente (*Ovum Pick-Up*; OPU). Independientemente del proceso de recogida, los ovocitos se maduran, fecundan y cultivan *in vitro*, hasta la fase de blastocisto. Al margen de la investigación, los EPIV tienen principalmente 2 destinos: transferencia a una hembra receptora (lo cual no siempre es posible) o crioconservación.

La crioconservación es una técnica que permite eliminar la dependencia de la actividad reproductiva cíclica de los animales, permitiendo reducir los costes derivados de la aplicación de la técnica y limitando la deriva genética. Además elimina patologías que normalmente se asocian al mantenimiento de animales vivos y hace posible la conservación de razas o especies en riesgo de extinción mediante la creación de bancos de embriones congelados (Diez *et al.*, 2010). Por todo ello, la crioconservación es un complemento de la fecundación *in vitro* ya que permite mantener bancos de embriones con fines de investigación, de preservación o comerciales.

En 1972 se produce en ratón el primer nacimiento a partir de un embrión producido *in vivo*, por superovulación y posterior lavado uterino de la hembra donante a la hembra receptora, y posteriormente congelado/descongelado (Whittingham *et al.*, 1972). En 1973 se produce el primer nacimiento en la especie bovina a partir de un embrión congelado producido *in vivo* y (Wilmut y Rowson, 1973). Desde entonces, se han desarrollado numerosos estudios para simplificar los procedimientos de congelación y descongelación, con el fin de permitir el uso rutinario de estas técnicas y aumentar la viabilidad embrionaria tras la descongelación.

Sin embargo, los EPIV presentan características morfológicas y metabólicas diferentes a los que se obtienen *in vivo* (Adrienne *et al.*, 2001). Se ha descrito que los EPIV son de menor calidad ya que presentan retraso en el desarrollo y son más sensibles a los procesos de congelación/descongelación como resultado de sus diferencias morfológicas y fisiológicas. Algunas de estas diferencias son: alteración estructural de la zona pelúcida (más resistente a la eclosión), menor grado de compactación celular, incremento del contenido lipídico intracelular, y menor tamaño y número celular. Además producen menores porcentajes de gestación, y los EPIV que llegan a término tienen más probabilidad de presentar el síndrome del ternero grande (*Offspring Syndrome*; LOS). Estas diferencias son debidas al medio ambiente subóptimo en el que se desarrolla el ovocito durante la maduración *in vitro* (MIV), durante la fecundación *in vitro* (FIV), y al sistema de cultivo embrionario utilizado. Cuanto más se prolonga el tratamiento *in vitro*, mayores son las diferencias entre los embriones producidos *in vivo* y los EPIV (Serrano Novoa *et al.*, 2002, Rizos *et al.*, 2008).

A todo ello hay que sumarle una reducida eficacia del método, ya que *in vitro* sólo el 30%-40% de los ovocitos fecundados se desarrollan hasta el estadio de blastocisto, (Diez *et al.*, 2010).

## CRIOCONSERVACIÓN

La criopreservación consiste en someter al material biológico a temperaturas bajo cero en Nitrógeno líquido (NL), (-196 C), temperatura a la que se ralentiza el metabolismo hasta un punto próximo a la detención. La muestra se preserva en un estado de viabilidad del que se podrá ser recuperado tras largos períodos de tiempo (Pandian *et al.*, 2004), pero debido a las propiedades del agua, una célula sin protección expuesta a temperaturas bajo cero forma cristales de hielo en su interior, causando lesiones que pueden provocar la muerte celular (Young, 2011).

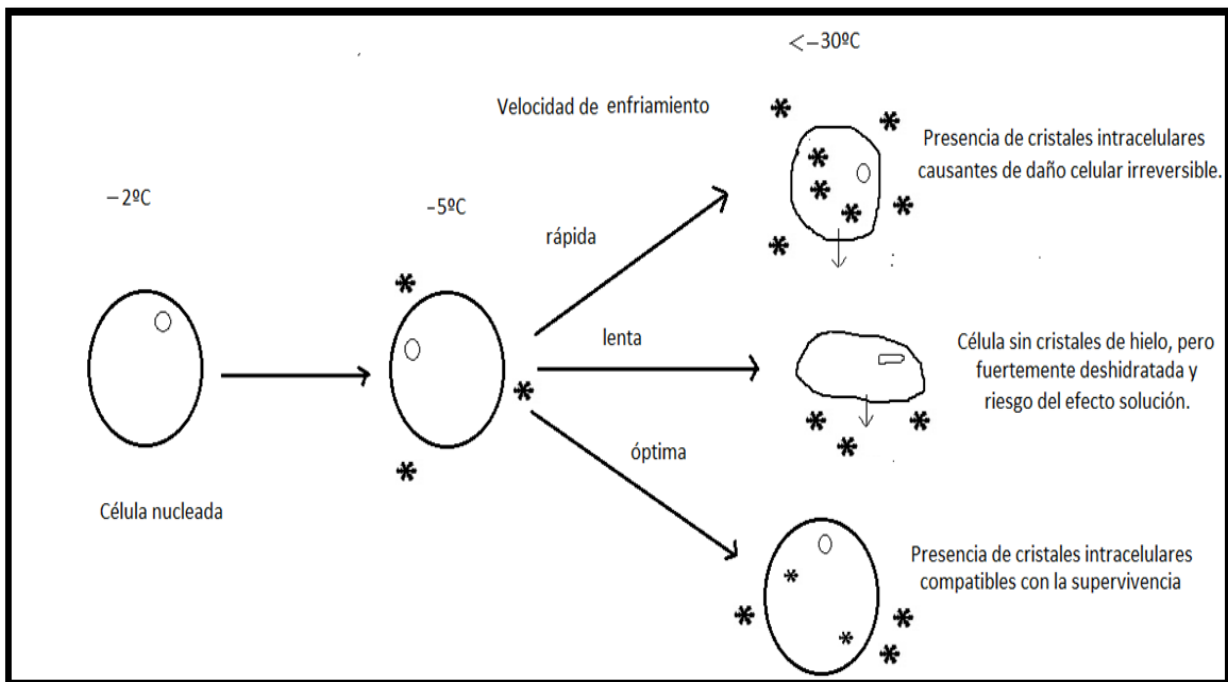
Cuando el agua es expuesta a temperaturas por debajo de 0°C (temperatura de congelación) las moléculas cambian a un estado sólido (hielo), sufriendo una reorganización molecular y una transformación termodinámica que permite al sistema mantenerse en un estado de mínima energía. La formación de hielo comienza en un punto del sistema (nucleación) a partir del cual comienza a crecer formando una red cristalina que altera los orgánulos intracelulares (citoesqueleto) y la estructura de las membranas. La nucleación puede ser homogénea, (a partir de un germen formado en la solución), o heterogénea (a partir de un cuerpo sólido microscópico en la fase líquida, como por ejemplo una impureza). Durante el cambio de estado se libera calor (calor latente) lo que tiende a elevar la temperatura por encima del punto de congelación, lo que provoca que la formación de hielo tenga lugar por debajo del punto del congelación, generalmente ente -5 y -15 °C (Shaw y Jones, 2003).

En una suspensión celular, el medio que contiene los embriones es más rico en agua que el medio celular. En consecuencia, el descenso térmico provoca la aparición de los primeros cristales de hielo en el medio extracelular sin que se produzcan cambios de fase en las células. Esta cristalización progresiva de la solución determina un aumento de la concentración de los solutos en la fracción no cristalizada, provocando la salida por ósmosis de una parte del agua contenida en las células y disminuyendo consecuentemente la formación de hielo intracelular.

Si el enfriamiento es demasiado rápido, el agua intracelular no puede salir en su totalidad, y el agua remanente formará cristales de hielo en el interior de las células, cristales que aumentaran de tamaño durante la congelación y la descongelación con perjuicio de las estructuras celulares.

Si, por el contrario, el enfriamiento es muy lento, la deshidratación progresiva de las células determina una elevación sensible de la concentración de solutos en el medio celular, modificando sus propiedades físico-químicas (efecto solución), fenómeno que conlleva también la pérdida de viabilidad de las células.

Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos, alterando sus funciones y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Celestinos y Gatica, 2002). Por tanto debe determinarse la velocidad de enfriamiento óptima para cada tipo de célula en función de parámetros específicos como la relación volumen/superficie de cada tipo celular, permeabilidad de la membrana al agua y a los CPs, y las variaciones de esta permeabilidad por efecto de la temperatura (ver figura 1).



**Figura 1. Modificaciones físicas de la célula en función de la velocidad de enfriamiento (Guyader-Joly, 1998)**

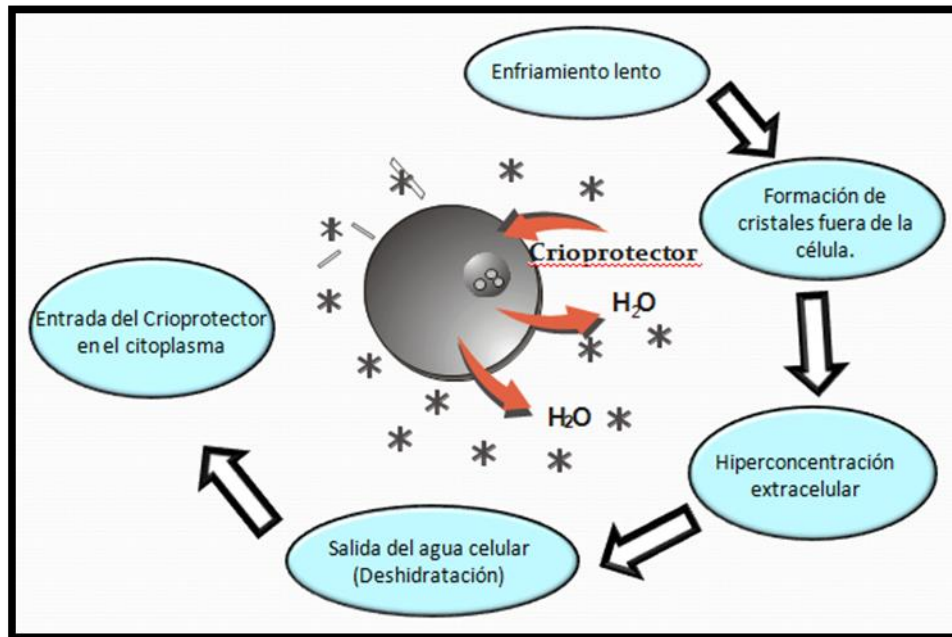
## MÉTODOS CRIOCONSERVACIÓN

### ➤ Método de equilibrio o congelación lenta

Como ya se ha explicado, una velocidad óptima de congelación debe conseguir una deshidratación parcial controlada para minimizar la formación de cristales de hielo en el interior celular y para evitar el efecto solución. Con el objetivo de conseguir la deshidratación máxima compatible con la viabilidad celular y evitar el *shock* osmótico,



deben incorporarse moléculas capaces de sustituir al agua en sus funciones biológicas. Estas sustancias son los llamados crioprotectores (CPs) (ver figura 2). El primer CP descrito fue el glicerol (Gly), utilizado por Polge en 1949 (Dinnyes *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Movimientos del agua y del CP durante la congelación lenta (Menes, 2012).

Los CP se dividen en dos clases (Pereira y Marques, 2008):

- Permeables. Son pequeñas moléculas que rápidamente atraviesan la membrana de la célula formando puentes de hidrógeno con moléculas de agua intracelular, disminuyendo el punto de congelación y retrasando la formación de hielo. El propileno-glicol (1,2-propanodiol; PROH), etilenglicol (EG), dimetil sulfóxido (DMSO), y glicerol son los CPs penetrantes más utilizados.
- No permeables, permanecen en el medio extracelular y por efecto osmótico provocan la salida del agua intracelular. A su vez pueden diferenciarse en:
  - Bajo peso molecular: azúcares (sacarosa, trehalosa, glucosa).
  - Alto peso molecular: macromoléculas (PVA, PVP, Ficoll).

En la congelación lenta el material a conservar se suspende en una solución con concentraciones relativamente bajas de CP (1-2M), lo que provoca un aumento de la presión osmótica en el medio extracelular. Para reducir el *shock* osmótico, los embriones pueden pasarse por soluciones con concentraciones crecientes de CP. Después del último lavado (cuando se alcanza la concentración final de CP) los

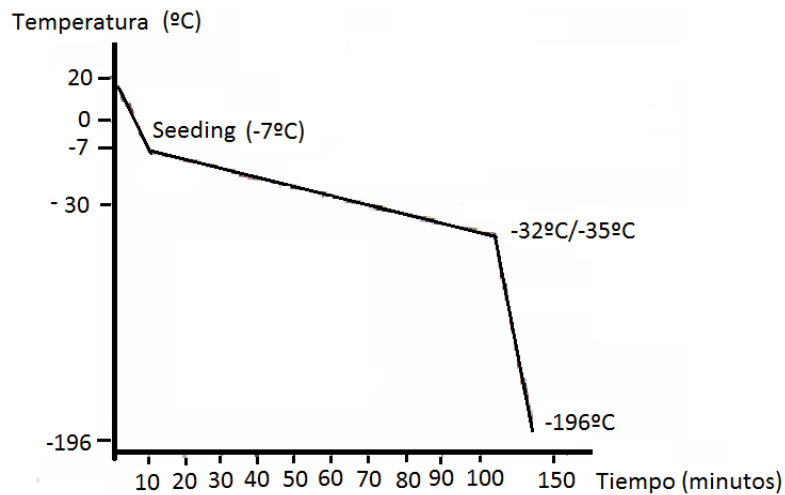
embriones se preparan para la congelación, generalmente en pajuelas de polipropileno de 0,25 ml.

Una vez dispuestos en la pajuela, ésta se coloca en el congelador programable y se inicia una primera rampa de descenso de la temperatura hasta llegar a  $-7^{\circ}\text{C}$ . Dependiendo de la muestra a congelar, y del CP empleado, la velocidad de enfriamiento de esta rampa puede variar. En el caso de los embriones bovinos congelados en EG, se ponen las pajuelas directamente en el biocongelador a  $-7^{\circ}\text{C}$ , sin rampa previa. A esta temperatura se induce la cristalización (nucleación) del medio extracelular (*seeding*) por enfriamiento de un punto de la pajuela mediante una pinza previamente sumergida en NL. Tras la cristalización, la formación progresiva de cristales de hielo en el medio que rodea a los embriones produce un aumento de la concentración de los electrolitos en la fracción todavía líquida, lo que lleva a un aumento de la presión osmótica y a la salida por difusión de una parte de agua intracelular, por lo que el embrión continúa deshidratándose. Tras el *seeding*, es necesario un período de espera de 5-15 minutos (para que se reestablezca el equilibrio) y a continuación comienza una segunda rampa de descenso de la temperatura a la velocidad de  $-0,1/-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  hasta llegar a  $-32/-35^{\circ}\text{C}$ . Durante toda esta segunda rampa se provoca la deshidratación progresiva y los embriones se colapsan por la pérdida de agua (Cabrera *et al.*, 2006).

A  $-32^{\circ}\text{C}/-35^{\circ}\text{C}$ , las células embrionarias han perdido gran parte del agua intracelular, y prolongar la fase lenta de enfriamiento expondría demasiado a las células al efecto solución, por lo que a esta temperatura las pajuelas se sumergen directamente en NL, provocando una tercera y última rampa de descenso, tras la cual termina el proceso de congelación (ver figura 3). Existen otros protocolos (para otros tipos de células), en los que la segunda rampa alcanza temperaturas más bajas, de forma que el grado de deshidratación celular conseguido es mucho mayor.

Finalizado el proceso de congelación los embriones se sumergen en NL para su almacenamiento. Se considera que la duración del almacenamiento no afecta a la supervivencia posterior.

La congelación lenta supone utilizar protocolos que duran un tiempo considerable (mínimo 2 horas) y requieren un biocongelador automático programable, lo que implica una importante inversión económica.



**Figura 3.** Descenso de la temperatura durante el proceso de congelación lenta (Baril *et al.*, 1995). Durante la congelación lenta tienen lugar 3 rampas de descenso, las 2 primeras con ayuda de un biocongelador programable .

El primer protocolo de crioconservación de embriones fue desarrollado en 1972 en ratón, y se basaba en un método de equilibrio que utilizó el DMSO como CP (Whittingham *et al.*, 1974).

### **Descongelación**

Los embriones congelados han sido deshidratados sólo parcialmente, e inevitablemente al sumergirlos en NL se forman en el interior pequeños cristales de hielo. Para evitar que durante la descongelación se produzca un aumento destructivo del tamaño de dichos cristales (fenómeno de recristalización), el proceso de descongelación debe ser lo más rápido posible (al menos del orden de 2.000°C/ minuto). Para ello las pajuelas extraídas del tanque de NL se mantienen 10 segundos en el aire y rápidamente se sumergen en un baño a una temperatura que oscilará entre los 20 °C y los 37 °C durante un tiempo de entre 20 y 30 segundos. La velocidad de calentamiento (determinada por la temperatura del agua), dependerá de la rampa de enfriamiento que se haya utilizado durante la congelación. Inmediatamente después es necesario proceder a la retirada del CP y la rehidratación del embrión.

Durante el calentamiento, los CPs deben ser retirados de los embriones antes de ser transferidos, ya que una vez en contacto con los fluidos uterinos isotónicos, se produce una sobrehidratación que provoca daños celulares irreversibles, con la consiguiente muerte embrionaria debido al *shock* osmótico (Larocca y Fernández, 1997). La eliminación de CP se efectúa en forma inversa a la de su adición, y existen varias opciones según el CP utilizado: dilución en varias etapas en soluciones con

cantidades decrecientes del CP, dilución en una única etapa, descongelación directa sin dilución del CP (Baril *et al.*, 1995). En la mayoría de los casos, es recomendable proceder a la eliminación progresiva del CP, de manera que los flujos de salida de los CPs y entrada de agua sean compatibles con la permeabilidad de la membrana plasmática, ya que si las células son expuestas directamente en un medio isotónico, las diferencias de presión osmótica provocarían una entrada demasiado rápida de agua en la célula, con el riesgo de rotura y consiguiente muerte celular. El riesgo de shock osmótico puede ser sensiblemente reducido si se utilizan CPs con altos coeficientes de permeabilidad, como el EG.

### **Eficiencia del método**

Como ya se ha comentado anteriormente, los EPIV presentan una menor calidad que los embriones producidos *in vivo*, y una de las consecuencias es una pérdida de la criotolerancia debido al aumento de los lípidos intracitoplasmáticos. Esta menor calidad embrionaria también se refleja en los porcentajes de gestación (ver Tabla 1).

**Tabla 1. Porcentajes de gestación en ganado bovino según el origen de los embriones.**

<b>ORIGEN DEL EMBRIÓN</b>	<b>% GESTACIÓN</b>
<i>In vivo</i>	E.F. 64,8%
	E.C. 59%
<i>In vitro</i>	E.F. 49,2%
	E.C. 37,8 %

**E.F.= Embriones frescos. E.C.= Embriones congelados. Cerstvých, 2002.**

#### ➤ **Métodos de no equilibrio**

- **Vitrificación clásica en pajueta.**

Descrita por primera vez en ratones en 1985 (Ali y Shelton., 1993). La técnica se basa en la combinación de altas velocidades de enfriamiento/calentamiento y el uso de soluciones con altas concentraciones de CPs, que confieren al medio una elevada viscosidad, como consecuencia de lo cual tiene lugar la transformación de la suspensión celular a un estado vítreo, sin que tenga lugar la formación de cristales de hielo. Las altas velocidades de enfriamiento provocan una inmovilización de las moléculas de agua de forma desordenada que impide su organización en estructuras cristalinas. Las

primeras vitrificaciones fueron realizadas en pajuelas de 0,25 ml en las que los embriones eran aspirados al interior de la pajuela en la solución con el CP, y se vitrificaban por inmersión directa en NL (Cabrera *et al.*, 2006).

Si bien, la gran ventaja de la vitrificación es que no se forman cristales de hielo, su gran inconveniente son las elevadas concentraciones elevadas de CP que se utilizan (del orden de 7-8M), que provocan problemas de toxicidad y de *shock* osmótico (Kamath *et al.*, 2011). El grado de toxicidad de un CP está determinado por su concentración y por la permeabilidad de la membrana, que es específica de la especie y del estadio de desarrollo del embrión. A diferencia de los embriones *in vivo*, los EPIV son más sensibles a la crioconservación en fases tempranas del desarrollo, siendo el mejor momento para la crioconservación el estadio de blastocisto expandido (Vatja *et al.*, 1996).

La concentración de CP precisa para mantener la viabilidad embrionaria es inversamente proporcional a la temperatura de enfriamiento, de forma que elevadas velocidades de enfriamiento permiten disminuir la concentración de CP (Cabrera *et al.*, 2006). En el método clásico, el aumento de la velocidad de enfriamiento se consigue simplemente introduciendo las pajuelas con los embriones en el tanque de NL (con o sin paso previo por vapores de NL), consiguiendo velocidades de enfriamiento de 2.500°C/minuto y velocidades de calentamiento de 1.300°C/minuto al sacar la pajuela del NL. No obstante, a lo largo de los últimos años se han desarrollado modificaciones de la técnica que han permitido aumentar aún más las velocidades de enfriamiento/calentamiento y disminuir la concentración de CP para conseguir una mayor viabilidad embrionaria post-calentamiento (Kader *et al.*, 2009). Algunas de estas variaciones son:

- ✓ **Combinación de varios CP**, la combinación de 2 CPs disminuye la toxicidad específica de cada uno de ellos, permitiendo una disminución de la concentración de cada uno de los CPs, haciendo que la solución sea menos tóxica para las células.
- ✓ **Adición de macromoléculas** (PVA, PVP, Ficoll,) y **sacáridos** (sacarosa, trehalosa) a la solución de vitrificación, que ayudan a la expulsión del agua del blastocele, favoreciendo la deshidratación.
- ✓ **Adición de pasos intermedios** para permitir la penetración de los CPs de forma gradual y disminuir el riesgo de *shock* osmótico.

## **Calentamiento**

Al igual que en la congelación, los CPs deben ser retirados de los embriones antes de ser transferidos. Esta retirada puede realizarse por dos métodos:

- a) Mediante dilución dentro de la pajuela. Consiste en transferir los embriones vitrificados desde la pajuela en la que se almacenan a otra pajuela de 0,25ml conteniendo sacarosa 0,2M (a 39°C). Esta nueva pajuela con los embriones es cargada en una pistola para realizar la transferencia a la hembra receptora (Larocca y Fernández, 1997).
- b) Mediante dilución fuera de la pajuela. Consiste en incubar a los embriones en sucesivas soluciones con concentraciones decrecientes del disacárido de elección.

## **Eficacia del método**

En un estudio realizado por Lewis *et al.* (1999) el porcentaje de receptoras gestantes fue un 64% para el método de dilución dentro de la pajuela, y 40% para el método de dilución fuera de la pajuela, lo que indica que con el método de vitrificación dentro de la pajuela pueden obtenerse porcentajes de preñez relativamente buenos. Sin embargo, esta metodología no ha tenido mucha aceptación en la industria de la transferencia de embriones posiblemente por la complejidad del proceso de ensamblaje de las pajuelas y por la variabilidad de los porcentajes de gestación, ya que no es posible realizar evaluación morfológica de los embriones que se van a transferir (Larocca y Fernández, 1997). Por ello, a lo largo de los años siguientes se han venido realizando numerosos estudios con el objetivo de desarrollar una técnica de calentamiento rápida, fácil y eficaz.

### **Vitrificación Ultrarrápida**

El incremento de las velocidades de intercambio térmico pasa por la utilización de técnicas de mínimo volumen, en los que el tamaño de los soportes empleados, y el espesor de sus paredes, reducen la cantidad de la muestra a vitrificar y mantienen las células más cerca de la fuente de frío/calor, consiguiéndose velocidades de enfriamiento y calentamiento muy altas. Surgen así los protocolos de vitrificación ultrarrápida. Los dispositivos que permiten una velocidad de enfriamiento ultrarrápida más frecuentemente utilizados son:

- **Open Pulled Straw (OPS)**, fue el primer soporte desarrollado por Vajta *et al* (1998). El OPS se obtiene por estiramiento de una pajuela clásica de 0,25 ml para disminuir su diámetro y el grosor de la pared. Se logra así disminuir el volumen de la muestra y permite el contacto directo con la fuente de NL, con lo que se consiguen velocidades de enfriamiento de 16.000°C/minuto y velocidades de calentamiento de 13.900°C/minuto (Díez, 2012). El contacto directo con el NL es el mayor limitante de esta técnica, ya que durante el almacenamiento existe la probabilidad potencial de transmisión de agentes infecciosos (De Paz *et al.*, 1994).
- **Cryoloop**, consiste en un lazo de nylon (0,5 a 0,7 mm de diámetro) en cuyo interior se crea una película de medio con los embriones (ver figura 4). Se consiguen velocidades de enfriamiento de 32.000°C/minuto y velocidades de calentamiento de 21.000°C/minuto (Díez, 2012). Es un sistema abierto.



Figura 4. *Cryoloop* ([www.sb.fsu.edu/~xray/Manuals/2004XRF\\_Manual-KLB.html](http://www.sb.fsu.edu/~xray/Manuals/2004XRF_Manual-KLB.html))

- **Cryotop**, sistema en el que los embriones se depositan sobre una fina lengüeta de polipropileno unida a un mango (Vajta y Kuwayama., 2006) que luego se introduce en una pajuela superenfriada, permitiendo un sistema de almacenamiento cerrado (no hay contacto con el NL). Con este dispositivo el volumen final es 10 veces inferior al que utilizan los otros sistemas de mínimo volumen, con lo que se consiguen aún mayores velocidades de enfriamiento (42.100 °C/minuto), y calentamiento (23.000°C/minuto) (Díez, 2012).

- **Fibreplugs**, sistema en el que los embriones se cargan en un volumen de 0,5µl/embrión sobre una estructura en forma de gancho denominada *Fibreplug* (ver figura 5) que se pone en contacto con una superficie metálica previamente enfriada en NL. Al igual que en el caso del *Cryotop*, el *Fibreplug* se introduce en una pajuela superenfriada, permitiendo un almacenamiento cerrado. Este soporte permite velocidades de enfriamiento de 40.000°C/minuto, y velocidades de calentamiento de 20.900°C/minuto (Díez, 2012).

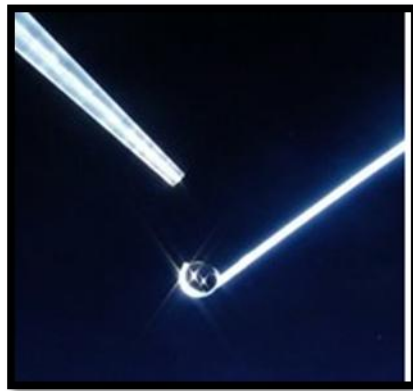


Figura 5. *Fibreplug* ([www.cryologic.com/cvm.htm](http://www.cryologic.com/cvm.htm)).

### Calentamiento

Para recuperar la muestra vitrificada debe llevarse a cabo el calentamiento, que supone la pérdida del estado vítreo con la posibilidad de formación de cristales de hielo (recristalización) y la consiguiente pérdida de viabilidad embrionaria. Por ello la velocidad de calentamiento ha de ser extremadamente alta, ya que enfriamientos/calentamientos ultra-rápidos no proporcionan tiempo suficiente para la formación y crecimiento del hielo (Rall, 1987).

La retirada de los CPs se realiza de forma progresiva. Para acelerar el proceso, a las soluciones de calentamiento se añade sacarosa (u otros azúcares), que no penetran en las células por simple difusión, pero que generan un aumento de la presión osmótica del medio extracelular, favoreciendo la salida masiva de CPs desde el compartimento intracelular.

Actualmente para la vitrificación de EPIV bovinos se tiene como referencia la técnica de vitrificación (y calentamiento) propuesta por Vatja *et al.* (1998), en la que se utiliza una combinación de DMSO y EG. En este protocolo, el calentamiento de los



embriones se realiza en dos incubaciones consecutivas de 5 minutos en presencia de sacarosa 0,25M, y 0,15M respectivamente. Este proceso de calentamiento en etapas es el principal obstáculo que presenta la vitrificación a la hora de su aplicación en el campo (Inaba *et al.*, 2011).

En el caso del ganado bovino, la mejora de los protocolos de vitrificación, pasa por la posibilidad de realizar el calentamiento de los embriones en un solo paso, lo cual simplificaría el proceso y permitiría la transferencia directa por los técnicos que trabajan en las explotaciones.

Una modificación de la técnica de *OPS* (Vajta *et al.*, 1999), permite la transferencia directa de embriones vitrificados por este sistema, sin embargo la complejidad del manejo de los embriones hace que tenga que ser llevada a cabo por personal cualificado, lo cual impide que se implante como técnica de rutina en las granjas.

La dilución de los CPs en la propia pajuela de transferencia también fue abordada por Taniguchi *et al.* (2007), de forma que el calentamiento de los embriones se realizaba en un solo paso. Sin embargo, en este caso, los autores empleaban un protocolo de vitrificación clásica (en pajuelas de 0,25 ml).

Una modificación reciente del protocolo de vitrificación en *Cryotop* permite la vitrificación ultrarrápida combinada con un protocolo de calentamiento que puede ser realizado por personal no cualificado con cierto entrenamiento (Inaba *et al.*, 2011).

### **Eficacia del método**

Las diferencias que existen entre los embriones producidos *in vitro* e *in vivo* hacen que su resistencia a los diferentes procedimientos de criopreservación sea diferente.

Dadas las especiales características de estos EPIV, la vitrificación es el método de elección para su crioconservación (Inaba *et al.*, 2011), pero no ha sido aceptada como técnica de rutina por los técnicos que realizan las transferencias debido a la falta de una tecnología estándar y a los requerimientos de manipulación del embrión durante el calentamiento.

### **PARÁMETROS VIABILIDAD EMBRIONARIA EN BOVINO**

El valor de la criopreservación en la reproducción asistida en bovinos queda claramente ilustrado por el gran número de embriones que son congelados y transferidos cada año (el 60% en 2011, AETE). Dado que las aplicaciones tienen una gran importancia tanto científica como comercial, se han realizado numerosos estudios que

permiten evaluar la viabilidad de los embriones post-calentamiento para así obtener gestaciones viables.

El mejor indicador de viabilidad embrionaria es la capacidad de dar lugar a una gestación que llegue a término, produciendo una cría viable. No obstante, en el caso del ganado vacuno, la evaluación de los porcentajes de preñeces es un proceso muy largo (debido a la duración de la gestación en esta especie) y costoso. Por ello, se han desarrollado una serie de técnicas que aportan información sobre la calidad embrionaria que evitan (aunque sólo parcialmente) el tener que recurrir a la transferencia de embriones.

Los métodos morfológicos valoran aspectos como la uniformidad de los blastómeros, la textura citoplasmática, el tamaño del embrión, y su color (que es indicador del contenido lipídico). De esta forma se puede clasificar a los embriones en 4 categorías (1, 2, 3 y 4) que dan lugar a diferencias significativas en los porcentajes de gestación tras su transferencia (45%, 44%, 27% y 20% respectivamente; Gordon, 1994). El gran inconveniente de esta clasificación es su alta subjetividad y la elevada tasa de error, lo que llevó al desarrollo de técnicas objetivas del análisis de la calidad embrionaria.

#### ➤ **Supervivencia a la crioconservación.**

Los porcentajes de supervivencia post-calentamiento son indicadores de calidad embrionaria (Gordon, 1994). Los parámetros normalmente evaluados son los porcentajes de re-expansión del embrión a las 2, 24 y 48 horas, y los porcentajes de eclosión a las 24 y 48 horas.

#### ➤ **Análisis de las poblaciones celulares.**

El número de células, así como su grado de diferenciación están altamente relacionadas con la calidad embrionaria (Gordon, 1994) y por ello son objeto de estudio mediante técnicas de tinción.

En el blastocisto se diferencian dos tipos celulares: la masa celular interna (MCI), constituida por el grupo de células pluripotentes que se sitúa en el polo embrionario del blastocisto y que dará lugar al embrión, y el trofotodermo (TE), formado por células diferenciadas que ocupan la periferia del blastocisto y que darán lugar a la formación de la placenta y anejos fetales.

La tinción vital permite determinar el número de células vivas del embrión (Pryor *et al.*, 2011), mientras que la tinción diferencial permite un recuento de las células de la MCI y del TE (Thouas *et al.*, 2001). Ambas proporcionan información sobre la calidad del embrión.

En los EPIV, el número de células totales y el número de células de la MCI son superiores en embriones de grado 1 y 2 que en embriones de grado 3 y 4. Además el número total de células es similar al de los producidos *in vivo*, aunque el número de células de la MCI es menor (Iwasaki *et al.*, 1990).

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método fácil y eficaz de calentamiento en un solo paso que permita la transferencia directa de los embriones usando como soporte el *Fibreplug*. Para ello, se analizará el efecto de 4 protocolos de calentamiento de embriones vitrificados en *Fibreplugs*, sobre la supervivencia embrionaria (re-expansión y eclosión) y el porcentaje de células vivas/totales en los embriones que eclosionan tras el calentamiento.

Nuestra hipótesis: durante el calentamiento de EPIV bovinos, las variaciones propuestas en concentración y tiempo de exposición a la sacarosa no producen pérdida de viabilidad embrionaria ni pérdida de viabilidad celular, permitiendo realizar el proceso de calentamiento en un solo paso.

## **MATERIALES Y METODOLOGÍAS**

Salvo que se especifique lo contrario, todos los reactivos utilizados fueron suministrados por Sigma (Madrid). Todos los medios de cultivo se elaboraron con agua Milli-Q (Tipo 1).

### ➤ **Producción de embriones *in vitro***

- **Maduración *in vitro* de los ovocitos.**

Los ovarios utilizados procedieron de vacas sacrificadas en el matadero de Noreña, Asturias, y se trasladaron al laboratorio en solución salina (NaCl 0,9%) con penicilina/estreptomicina a 25-30 °C. El tiempo transcurrido desde la recogida de los ovarios, hasta su procesamiento no superó las dos horas.

Los complejos *cumulus*-ovocito (CCOs) se aspiraron a partir de folículos visibles de 2 a 7 mm de diámetro, con una aguja de 18 G conectada a una jeringuilla de 10 ml, y se recogieron en un tubo Corning® de 50 ml con medio de mantenimiento (MM: TCM-199® + 25 mM HEPES + 0,4 g/l albúmina sérica bovina - BSA -). El sedimento del líquido folicular aspirado se recogió con una pipeta Pasteur de vidrio y se pasó a una placa de Petri de 90 mm, en la que se buscaron los CCOs con ayuda de un estereomicroscopio a 20x. Se seleccionaron sólo aquellos ovocitos con citoplasma homogéneo, *cumulus oophorus* compacto y rodeados, al menos, por tres capas de células de la granulosa (60x).

A continuación, los ovocitos se lavaron 2 veces en placas Petri de 35mm con MM y otras 2 veces en medio de maduración (TCM199 + 10% FCS (v/v) +1µg/ml FSH +5µg/ml LH +1µg/ml 17 β-Estradiol). Por último, se dispusieron en una placa de cuatro pocillos (placa Well) colocando en cada pocillo entre 40-45 ovocitos en 500 µl de medio MIV. Se incubaron a 39°C y 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad durante 22-24 horas.

- **Fecundación *in vitro* (Día 0)**

Para la fecundación, se utilizó el procedimiento descrito por (*Parrish et al.*, 1986). El semen congelado utilizado correspondió a un sólo eyaculado de un mismo toro. En el momento de su uso, las pajuelas se descongelaron 5 segundos al aire y 30 segundos en un baño de agua a 37° C. Por cada pajuela descongelada

se preparó 1 criotubo con 1ml de medio (*Sperm* -TALP, ver Tabla 2) previamente descongelado y atemperado a 38°C. Para realizar la separación de espermatozoides motiles (*Swim-Up*) se distribuyó el semen a razón de 170 µl por cada criotubo, depositándolo cuidadosamente en el fondo, donde permaneció 1 hora a 39° C y con 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabla 2. Composición del medio *Sperm*-TALP.**

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
Hepes	10 mM
BSA	6%
NaCl	114 mM
KCl	3,22 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,30 mM
MgCl <sub>2</sub>	0,49 mM
CaCl <sub>2</sub>	2,04 mM
Lactato sódico	35 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Piruvato sódico	1,006 mM
Gentamicina	10 mg/ml
Rojo fenol	10 mg/ml

Transcurrida la hora, se centrifugó el sobrenadante (750-800 µl) a 200 x G durante 7 minutos en un tubo de centrifuga estéril y se desechó el sobrenadante. Se calculó la concentración espermática del pellet en cámara de Thoma, y se verificó que su motilidad fuera la adecuada tras una observación entre porta y cubre. Sólo se consideraron aptas para la fecundación aquellas muestras con un porcentaje de espermatozoides vivos superior al 60 %.

Tras 2 lavados en MM y 3 en medio de fecundación (medio *Fert*-TALP, ver tabla 3), los ovocitos se depositaron en placas de cuatro pocillos (máximo 100

ovocitos/500 µl de medio) a la espera de los espermatozoides, que se añadieron a una concentración de 2 millones de espermatozoides por mililitro de medio de fecundación. Los gametos se coincubaron durante 18-20 horas a 39 °C, con 5 % de CO<sub>2</sub> y con humedad saturada del 90%.

**Tabla 3. Composición del medio *Fert-TALP*.**

Componente	Concentración
NaCl	114,06 mM
KCl	3,32 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,30 mM
MgSO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	0,49 mM
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2,04 mM
Lactato sódico	3,06 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Piruvato sódico	1,006 mM
Gentamicina	10 mg/ml
Rojo fenol	10 mg/ml
BSA	6%
Heparina	10 µg/ml

- **Cultivo *in vitro* (Día 1 a Día 8)**

Completado el periodo de fecundación, las células del *cumulus* y los espermatozoides sobrantes se retiraron agitando los cigotos durante 2 minutos en el vórtex (1800 rpm) en un tubo de centrifuga con MM. A continuación, los presuntos cigotos se lavaron 3 veces en MM y 2 veces en medio de cultivo, pasándose después a una microgota del mismo medio. El medio de cultivo utilizado fue Fluido Oviductal Sintético (SOF) suplementado con 6 g/L de BSA (SOF-6; ver tabla 4). Las microgotas de SOF-6 (50 µl) se prepararon ajustando el número de cigotos a cultivar (1-1,5 µl/cigoto), se cubrieron con aceite mineral y se equilibraron un mínimo de 2 horas. El cultivo embrionario fue realizado a 38,9°C, con 5 % O<sub>2</sub>, y 5 % CO<sub>2</sub>. La renovación de los medios se realizó los días 3 y 6, y la valoración del desarrollo embrionario en los días 3, 6, 7 y 8.

**Tabla 4. Composición del medio mSOF.**

Componente	Concentración
NaCl	107,63 mM
KCl	7,16 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,19 mM
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,51 mM
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	1,78 mM
Lactato sódico	5,35 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
Piruvato sódico	7,27 mM
L-Glutamina	0,20 mM
Aminoácidos esenciales	45 µl/ml
Aminoácidos no esenciales	5 µl/ml
Tri-citrato sódico	0,34 mM
Myo-inositol	2,77 mM
Rojo fenol	10 µg/ml

### ➤ **Vitrificación**

Para la vitrificación se utilizó el *Cryologic Vitrification Method* (CVM), con las soluciones descritas por Vajta *et al.* (1998).

A una temperatura ambiental de 30°C, y con los medios a 41°C sobre superficie calefactada, los blastocistos expandidos se lavaron 2 veces en medio de mantenimiento de vitrificación (MMV, compuesto por TCM-199 HEPES + 20% FCS) incubados en medio VS1 (MMV + 7,5 % EG + 7,5% DMSO) durante 3 minutos y transferidos al medio VS2 (MMV + 16,5% EG + 16,5% DMSO + sacarosa 0,5M) donde permanecieron 20 segundos. A continuación, se colocaron grupos de 5 blastocistos en un volumen de 3 µL sobre un *Fibreplug*, se vitrificaron por contacto directo con un bloque de acero superenfriado, y se introdujo en una pajuela previamente enfriada. Finalmente las pajuelas se almacenaron en un tanque de NL (Cabrera *et al.*, 2006).



## ➤ Calentamiento

Se establecieron 4 grupos experimentales (ver tabla 5):

- **Grupo A** (control), basado en el método de calentamiento descrito por Vajta *et al.* (1998). Se sumergió el *Fibreplug* en medio MS1 (Medio MMV + sacarosa 0,25 M), donde se incubaron durante 5 minutos. A continuación se realizó una nueva incubación de los embriones en medio MS2 (MMV + sacarosa 0,15 M) durante otros 5 minutos.
- **Grupo B.** En este protocolo el *Fibreplug* se sumergió directamente en medio MS1, seguido de una incubación de los embriones en el mismo medio durante 10 minutos.
- **Grupo C.** Se sumergió el *Fibreplug* en MS2, y se incubaron los embriones en el mismo medio durante 10 minutos.
- **Grupo D.** En este tratamiento se sumergió el *Fibreplug* en MS1 y se incubaron los embriones en el mismo medio durante 5 minutos.

**Tabla 5 Protocolos de calentamiento experimentales**

PROTOCOLO	Sacarosa 0,25M	Sacarosa 0,15M
<b>A(Control)</b>	5 minutos	5 minutos
<b>B</b>	10 minutos	NO
<b>C</b>	NO	10 minutos
<b>D</b>	5	NO

Tras el calentamiento los embriones se lavaron en MMV y se cultivaron en microgotas de SOF-6 + 10 % de suero fetal bovino (FCS) durante 48 horas. Se analizaron los índices de re-expansión a las 2, 24 y 48 horas post-calentamiento, y la eclosión a las 24 y 48 horas post-calentamiento.

### ➤ **Recuento celular**

#### • **Tinción vital**

A las 48 horas del calentamiento, los blastocistos expandidos y eclosionados se lavaron en PBS y se incubaron durante 30 minutos en microgotas (50µl) de una solución de Ioduro Propidio [5µg/ml] y Bisbenzimidida [2,5µG/ml] recubiertas de una capa de aceite mineral (800µl) en oscuridad, a 39°C (Pryor *et al.*, 2011 modificada).

Pasado este tiempo se montaron los embriones entre porta y cubre en una gota de glicerol, se observaron en un microscopio de fluorescencia con un espectro de excitación de 360 a 370 nm y un filtro de barrera de 420 nm, y se fotografiaron.

La bisbenzimidida es un colorante permeable a la membrana plasmática y penetra en todas las células, mientras que el ioduro de propidio, sólo penetra en las células que tienen la membrana dañada. De esta forma se teñirán de color azul las células vivas y de rosa (azul + rojo) las que tengan dañadas la membrana plasmática. El recuento celular se realizó con la ayuda del programa informático Olympus-DP-Soft.

### ➤ **3.5 Diseño Experimental**

Se compararon los porcentajes de supervivencia (re-expansión) a las 2, 24 y 48 horas, y los porcentajes de eclosión a las 24 y 48 horas de los embriones calentados con los protocolos experimentales propuestos. Además se analizó el efecto de cada uno de los tratamientos sobre el número total de células de los embriones que eclosionaron tras el calentamiento, y sobre el porcentaje de células vivas con relación al número total de células del embrión.

### ➤ **3.6 Análisis estadístico**

Los datos de desarrollo *in vitro* y recuento celular se analizaron mediante el procedimiento general de modelos lineales (GLM; paquete estadístico SAS) y el test de Duncan. Los resultados se presentan como *Least Square Means ± Standard error* (LSM±SE). Las repeticiones y el grupo experimental se consideraron efectos fijos.

## RESULTADOS

- Efecto de la variación de concentración y duración de la exposición a sacarosa durante el calentamiento sobre la supervivencia de EPIV bovinos.

**Tabla 6. Efecto del protocolo de calentamiento sobre la supervivencia de embriones bovinos producidos *in vitro* vitrificados por la técnica CVM.**

Protocolo calentamiento	N	2 horas		24 horas		48 horas	
		% RE	% RE	% EC	% RE	% EC	
A	249	89,3±4,2	87,5±5,2	41,2±4,8	87,2±5,7	64,7±5,9	
B	283	89,7±4,3	88,2±5,3	46,2±4,9	85,4±5,8	62,3±6,0	
C	267	92,6±4,3	92,7±5,3	39,5±4,9	90,8±5,9	60,3±6,1	
D	266	88,3±4,2	84,6±5,2	40,1±4,8	82,2±5,7	57,4±5,9	

**N: número de embriones puestos en cultivo tras el calentamiento; réplicas de calentamiento: 8. RE: blastocistos re-expandidos. EC: blastocistos eclosionando. No hay diferencias significativas ( $p<0,05$ ).**

Se vitrificó y calentó un total de 1065 embriones bovinos producidos en 10 réplicas y calentados en 8 repeticiones. Tal y como se muestra en la tabla 6, no se encontraron diferencias significativas entre los 4 tipos de protocolos de calentamiento en cuanto a su efecto sobre la supervivencia embrionaria ( $p<0,05$ ).

Los porcentajes de supervivencia a las 2 horas post-calentamiento fueron del orden del 90%, valor que se mantuvo sin prácticamente variaciones a las 24 y 48 horas.

A las 48 horas los porcentajes de eclosión se incrementaron con relación a los observados a las 24 horas y se mantuvieron en valores próximos al 60%.

Efecto de la variación de concentración y duración de la exposición a sacarosa sobre la viabilidad celular post-calentamiento.

**Tabla 7. Efecto del protocolo de calentamiento sobre el número de células vivas y muertas y el porcentaje células vivas/células totales de embriones bovinos producidos *in vitro* vitrificados por la técnica CVM.**

Protocolo calentamiento	N	Vivas	Muertas	Totales	% Vivas/Totales
A	61	167,2±7,1	5,4±1,5	172,6±7,3	96,7±0,9
B	62	173,2±6,9	8,9±1,5	182,1±7,1	94,4±0,9
C	45	164,5±7,5	6,1±1,6	170,6±7,6	95,8±1,0
D	74	168,2±6,6	6,9±1,4	175,2±6,7	96,1±0,9

N: número de embriones puestos en cultivo tras el calentamiento; réplicas de tinción: 5.. No hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Se realizaron 5 réplicas de tinción en las que se procesó un total de 242 embriones bovinos. Tal y como se muestra en la tabla 7, las modificaciones de los protocolos de calentamiento no produjeron diferencias significativas en el número de células totales de los embriones que sobrevivieron a la vitrificación, ni en el porcentaje de células vivas/totales ( $p < 0,05$ ).

## **DISCUSIÓN**

En el presente trabajo hemos diseñado un protocolo de calentamiento en un paso único, para ser aplicado en embriones bovinos producidos *in vitro*, y vitrificados por la técnica CVM en *Fibreplugs*.

La vitrificación es una técnica de crioconservación rápida y económica, que permite obtener buenos porcentajes de supervivencia embrionaria, permitiendo la criopreservación efectiva de EPIV. Tradicionalmente, tras el calentamiento de los embriones, la retirada de los CPs se suele realizar en varias etapas, sometiendo al embrión a incubaciones sucesivas en medios con concentraciones decrecientes de sacáridos. Estos procedimientos conducen a un descenso de la presión osmótica extracelular ocasionando la masiva salida de CPs desde el espacio intracelular y la consiguiente entrada de agua e hidratación.

Estas incubaciones se realizan en varios pasos para evitar el riesgo de *shock* osmótico causado por la elevada concentración de CPs en las que se encuentran los embriones. Son precisamente estos múltiples pasos lo que dificulta la difusión de la técnica de producción de embriones *in vitro*, ya que requiere unas condiciones ambientales especiales, y una determinada manipulación del embrión, lo que exige una adecuada formación del técnico.

Debido a este hecho, numerosos equipos se han centrado en desarrollar una modificación de la técnica que permita el calentamiento en un paso único, condición imprescindible para que se pueda abordar la transferencia directa.

Nuestros resultados de supervivencia (% de re-expansión) y de eclosión coinciden con los presentados por Cabrera *et al.* (2006), que afirman que la utilización de bajas concentraciones de sacarosa (0,1 y 0,3 M) durante el calentamiento tiene efectos positivos sobre la supervivencia de los EPIV bovinos. Además, estos autores demostraron que el uso de concentraciones más elevadas de sacarosa (0,5M) o su ausencia reducen significativamente los porcentajes % de re-expansión y de eclosión post-calentamiento (45% y 45,8%, respectivamente).

También nuestros datos son similares a los aportados por Young *et al.* (2006) quienes tras vitrificar EPIV bovinos por el método CVM, obtuvieron % de re-expansión a las 24 horas y % de eclosión a las 48 horas del 88,2% y 77,1%, respectivamente. Por

su parte, Inaba *et al.* (2011) demostraron que, independientemente de la concentración de sacarosa, incubaciones prolongadas (30 minutos) en soluciones de calentamiento producen menores índices de re-expansión y de eclosión a las 24 y a las 72 horas post-calentamiento que incubaciones de 10 minutos.

Este equipo valoró la ausencia/presencia de sacarosa (0,3 M) en el medio de calentamiento y el tiempo de exposición de los embriones a la misma. Calentaron embriones vitrificados durante 10 minutos en sacarosa 0,3M (nuestro protocolo de calentamiento B realizó una incubación de 10 minutos en sacarosa 0,25M) y obtuvieron porcentajes de supervivencia comparables a los nuestros (86,3% *vs* 89,7%), aunque sus porcentajes de eclosión a las 48 horas fueron más altos que los obtenidos en nuestro laboratorio (80,4% *vs* 62,3%).

Lo mismo sucede en nuestro protocolo de calentamiento D (5 minutos en 0,25M) muy similar a otro de los propuestos por dichos autores (5 minutos en 0,3 M); si bien los datos de supervivencia son ligeramente superiores en el caso de Inaba *et al.* (2011) (96,2% *vs* 84,6%), los porcentajes de eclosión a las 48 horas son notablemente más bajos en nuestro estudio (94,3% *vs* 57,4%).

Las diferencias entre ambos estudios pueden ser debidas a que los métodos de vitrificación empleados no fueron los mismos (*Cryotop* modificado *vs* CVM).

De igual forma, el sistema de vitrificación empleado puede explicar las diferencias entre los resultados de nuestro estudio y los obtenidos por Herrera *et al.* (2010), que tras calentar embriones vitrificados en *Cryoloops*, obtuvieron porcentajes de re-expansión y eclosión (54,08% y 48,45%, respectivamente, a las 48 horas post-calentamiento) inferiores a los nuestros.).

Por otra parte, nuestros resultados son muy superiores a los de Assumpção *et al.* (2008) (re-expansión a 24 horas: 23,15%; eclosión a 24 horas: 30,28%; eclosión a 48 horas 37,97%), aunque hay que especificar que estos autores utilizaron el sistema de vitrificación clásica, en pajuelas de 0,25ml, y emplearon Gly y EG como CPs, lo que podría explicar la diferencia de resultados.

Como ya hemos mencionado, el número de células y su distribución en el embrión son indicadores de calidad embrionaria. También la ratio células vivas/células totales aporta información sobre cómo diferentes técnicas aplicadas a los embriones pueden afectar a su posterior viabilidad.

Nuestros resultados demuestran que en las condiciones del ensayo, los diferentes protocolos de calentamiento empleados no sólo no afectaron a la supervivencia

embrionaria, sino que tampoco se vieron afectados el número de células ni el porcentaje de células vivas/células totales de los embriones eclosionados.

Tras la crioconservación, el índice de re-expansión y eclosión *in vitro* son aceptablemente altos, pero las tasas de gestación son bajas debido al daño celular (pérdida de la integridad de la membrana y alteraciones en el citoesqueleto) y/o a las alteraciones metabólicas ocasionadas durante el proceso. El tipo y la gravedad de estos daños dependen del método de crioconservación y de las condiciones en las que ésta se realice. Algunos de estos cambios son aparentemente reversibles, pero también pueden producir muerte embrionaria por disminución del nº de células viables del blastocisto (Kaidi *et al.*, 2001).

Los EPIV presentan una elevada crisisibilidad comparada con los *in vivo*, y tras la vitrificación presentan menos células debido a procesos de apoptosis (muerte celular programada). Mediante valoraciones en la fragmentación de DNA y expresión de ciertos genes (Caspasa 3, Hsp 70, entre otros), Young *et al.* (2006) evaluaron y compararon el índice apoptótico de EPIV frescos y EPIV vitrificados, obteniendo 3% y 11%, respectivamente. En otro estudio, Gómez *et al.* (2008) concluyeron que el aumento de la actividad apoptótica en los EPIV tras la vitrificación se concentra en la MCI, mientras que las células del TE no sufren alteraciones.

Se ha propuesto que dicho aumento en la apoptosis tras la vitrificación se produce para la eliminación de blastómeros de baja calidad cuya presencia podría comprometer la viabilidad embrionaria (Serrano Novoa *et al.*, 2002).

Si bien no hemos encontrado referencias en las que se analicen los porcentajes de células vivas/muertas como consecuencia del proceso de calentamiento, sí que algunos autores han analizado las poblaciones celulares de embriones vitrificados y posteriormente calentados. Novoa *et al.* (2002) vitrificaron y calentaron EPIV bovinos en pajuelas de 0,25 ml con EG y Gly. El calentamiento se desarrolló en 2 incubaciones de 5 minutos cada una (en soluciones con sacarosa 0,5 M y 0,25M). A las 24 horas post-calentamiento el 22,5% de los embriones evaluados tenían menos de 40 células totales, el 40% entre 40-60 células, el 7,5% entre 61-80, y sólo el 30% de los embriones estaban formados por más de 80 células. Los números de células encontrados por estos autores son muy inferiores a los nuestros, en los que se obtuvimos de media al menos 164 células en los 4 tratamientos. De nuevo estas diferencias se pueden explicar por el diferente soporte de vitrificación empleado.

Por su parte, Gómez *et al.* (2008) comprobaron que la vitrificación (OPS) de EPIV producidos en condiciones definidas redujo de forma significativa el número de células totales de los embriones (161 en embriones frescos vs 131 tras vitrificación/calentamiento), debido a un marcado descenso de las células de la MCI, y sin que se viera afectado el número de células del TE.

Nuestros datos nos permiten concluir que es posible calentar EPIV en un paso único en presencia de sacarosa (0,25 o 0,15M) sin que se vean afectados el número de células del embrión ni el porcentaje de células vivas/células totales. Sin embargo, son necesarios más estudios sobre las características de las poblaciones celulares (proliferación y diferenciación) así como la incidencia de apoptosis, antes de aceptar como válido alguno de los protocolos ensayados. En última instancia, será necesario abordar pruebas de supervivencia in vivo en las que se realice la transferencia de los embriones vitrificados/calentados a hembras receptoras para el análisis de los porcentajes de gestación.



## **CONCLUSIÓN**

El calentamiento de embriones bovinos producidos *in vitro* y vitrificados en un paso único, tras incubación en una solución de sacarosa 0,25M, o 0,15M permitió obtener porcentajes de supervivencia embrionaria y de viabilidad celular comparables a los obtenidos en el grupo control, en el que el calentamiento se realizó en dos etapas.

La reducción del tiempo de incubación de 10 a 5 minutos en la solución de sacarosa 0,25M tampoco tuvo efecto sobre los resultados de supervivencia embrionaria y viabilidad celular.

Es posible aplicar un protocolo de calentamiento de embriones bovinos vitrificados sin que se vea afectada su supervivencia *in vitro*.

Son necesarios nuevos experimentos destinados a evaluar los posibles efectos del uso de estos protocolos de calentamiento sobre los índices de gestación post-transferencia. Desde este trabajo se anima a otros investigadores a continuar en esta misma línea de estudio.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Adrienne E, Crosier P, Farin W, Michael J, Dykstra, Joseph E. Alexander, Farin CE. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction* 2001;64:1375–1385.
2. AETE, National Statistics of Embryo Transfer Activity. In Proceedings of 2011 Meeting of the Association Européene de Transfert d'Embryons, Chester. UK.
3. Ali J, Shelton JN, Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 98: 459-465.
4. Assumpção MEOA, Milazzotto MP, Simões R, Nicacio AC, Mendes CM, Mello MRB, Visintin JA. *In vitro* survival of *in vitro*-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. *Animal Reproduction* 2008;5(3/4):116-120.
5. Baril G, Brebion P, Chesné P. Manual de formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras. Ed. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 1995. Capítulo 12.
6. Cabrera P, Fernández A, Bastidas P, Molina M, Bethencourt A, Díaz T. Vitrificación: Una Alternativa para la Criopreservación de Embriones. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias* 2006;4 (1).
7. Celestinos M, Gatica MV. Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation. *Archivo De Medicina Vetetrinaria* 2002;34(2) DOI: 10.4067/S0301-732X2002000200002.
8. Cerstvých P. Viability of fresh and frozen transferred IVP bovine embryos. *Czech Journal Animal Science* 2002;47:261–267.
9. De Paz P, Sánchez AJ, Fernández JG, Carbajo M, Domínguez JC, Chamorro CA, Anel L. Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing. *Theriogenology* 1994;42:327-338.

10. Díez C, Muñoz M, Caamaño N, Gómez E. Biotecnologías reproductivas: Producción y criopreservación de embriones *in vitro*. Tecnología Agroalimentaria 2010;8:41 – 46.
11. Díez C. Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción.2011-2012
12. Dinnyes A, Liu J, Nedambale TL. Novel gamete storage. Reproduction, Fertility and Development 2007;19:719-731.
13. Gómez E, Muñoz M, Rodríguez A, Caamaño JN, Facal N, Díez C. Vitrification of Bovine Blastocysts *in Vitro* Inflicts Selective Damage to the Inner Cell Mass. Reproduction in Domestic Animals 2008;44(2):194-199.
14. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos.1994. Gab International. Capítulo 10.
15. Guyader-Joly C, Activité métabolique et aptitude a la congélation de l'embryon bovin produit *in vitro*. 1998. Thèse Doctorale.
16. Herrera EY, De Frutos C, Laguna-Barraza RA, Gutierrez-Adan, Rizos D. Effect of vitrification procedure on survival rate of bovine embryos produced *in vitro*. Reproduction, Fertility and Development 2010;23:149-15.
17. Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, Greve T. Callesen H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. Theriogenology 1999;52:683-700.
18. Inaba Y, Aikawa Y, Hirai T, Hashiyada Y, Yamanouchi T, Misum K, Ohtake M, Somfai T, Kobayashi S, Saito N, Matoba S, Konishi K, Imai K. In straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using cryotop. Journal of Reproduction and Development 2011;57:436-443.
19. Iwasaki S, Yoshida N, Yushijima H. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vivo* and *in vitro*. Journal of Reproduction and Fertility 1990;90:279-284.

20. Kader AA, Audrey CA, Orief Y, Agarwal A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2009, 7:99.
21. 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*. *Biology of Reproduction* 2001;65:1127–1134.
22. Kamath MS, Mangalaraj AM, Muthukumar K, Cullinan R, Aleyamma TK George K. Blastocyst cryopreservation using solid surface vitrification: A preliminary study. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2011;4(3):114–120.
23. Larocca CE, Fernández A. Congelación de embriones bovinos con etilén glicol vs. glicerol. *Archivos de Zootecnia* 199;46:295-300.
24. Lewis IM; Lane MW, Vajta G. Pregnancy rates following transfer of *in vitro* produced bovine embryos vitrified by the open pulled straw (OPS) method. *Theriogenology* 1999;51:168-175.
25. Menes LM. Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción. 2011-2012.
26. Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1986; 25: 591-600.
27. Pandian Z, Bhattacharya S, Ozturk O, Serour GI, Templeton A. Number of embryos for transfer following *in-vitro* fertilisation or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Systematic. Reviews*. 2004, Oct 18;(4):CD003416 Review.
28. Pereira RM, Marques CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Banking* 2008;9(4):267-77.
29. Pryor JH, Looney CR, Romo S, Kraemer DC, Long CR. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. *Theriogenology* 2011;75:24–33.

30. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987;24:387-402.
31. Rizos D, Clemente M, Bermejo-Álvarez P, de la Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán, A. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals* 2008;43 (Supl. 4):44-50.
32. Saragusty S, Amir A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification, *Reproduction* 2011;141:1–19.
33. Serrano Novoa CA, Rosa Sierra MV, Sánchez JE, Restrepo LF, Oliviera Angel M. Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos *in vitro*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2002;15:286-299.
34. Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update* 2003;9(6):583-605.
35. Taniguchi M, Ikeda A, Arikawa E, Wongsrikeao P, Agung B, Naoi H, Nagai T Otoi T. Effect of cryoprotectant composition on *in vitro* viability of *in vitro* fertilized and cloned bovine embryos following vitrification and in-straw dilution. *Journal of Reproduction and Development* 2007;53(4):963-9.
36. Thouas GA, Korfiatis NA, French A J, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reproductive Biomedicine Online* 2001;3:25-29.
37. Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Animal Reproduction Science* 1996;45:191-200.
38. 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. *Molecular Reproduction and Development* 1998;51:53–58.

39. Vajta G, Murphy CN, Macháty Z, Prather RS, Greve T, Callesen H. In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the open-pulled straw method. *Veterinary Record* 1999;144(7):180-1.
40. Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems, *Theriogenology* 2006;65:236–244.
41. Young PS, Young KE, Shun CX, Cheol TJ, Don LW, Hyung KN, Pill PS, Ho LJ. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zygote* 2006;14:125-131.
42. Youngs CR. Cryopreservation of Preimplantation Embryos of Cattle, Sheep, and Goats. *Journal of Visualized Experiments* 2011; (54), e2764, DOI:10.3791/2764.
43. Wilmut I, Rowson L. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record* 1973;92:686-690.
44. Whittingham DG, Leibo SP, Manzur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. *Science* 1972;187:411-414
45. Whittingham G. The viability of frozen-thawed mouse blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility* 1974;37:159-162.
46. [www.cryologic.com/cvm.htm](http://www.cryologic.com/cvm.htm)
47. [/www.sb.fsu.edu/~xray/Manuals/2004XRF\\_Manual-KLB.html](http://www.sb.fsu.edu/~xray/Manuals/2004XRF_Manual-KLB.html)