

**Universidad de Oviedo**

**Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción**

---

**ADAPTACIÓN DE UN MÉTODO DE  
VITRIFICACIÓN/CALENTAMIENTO EN *FIBREPLUG* PARA LA  
TRANSFERENCIA DIRECTA DE BLASTOCISTOS BOVINOS  
PRODUCIDOS *IN VITRO***

---

**AUTOR:**

**ELSA IZAGUIRRE FERNÁNDEZ**

**TUTOR ACADÉMICO:**

**CARMEN DÍEZ MONFORTE**

**JUNIO 2012**

D<sup>a</sup> Carmen Díez Monforte, Jefa del Departamento de Investigación en SERIDA (Villaviciosa) por la presente INFORMA:

Que la alumna D<sup>a</sup> Elsa Izaguirre Fernández ha realizado bajo su supervisión el Trabajo Fin de Máster titulado "Adaptación de un método de vitrificación/calentamiento en *Fibreplug* para la transferencia directa de blastocistos bovinos producidos *in vitro*". Dicho trabajo cumple las directrices exigidas y por ello autoriza la presentación del mismo.



**Fdo. Carmen Díez Monforte**

**En Oviedo a 10 de Junio de 2013**

## ÍNDICE

➤ <b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....	5
▪ <b>Crioprotectores: Elección del más adecuado</b> .....	8
▪ <b>Historia de la vitrificación</b> .....	10
▪ <b>Características Generales</b> .....	11
- Vitrificación Clásica.....	12
- Vitrificación Ultrarrápida.....	13
- Calentamiento.....	16
▪ <b>Daños durante la vitrificación</b> .....	17
➤ <b><u>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</u></b> .....	20
➤ <b><u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b> .....	21
▪ <b>Producción de embriones <i>in vitro</i></b> .....	21
- Obtención y maduración de ovocitos.....	21
- Fecundación <i>in vitro</i> .....	22
- Cultivo <i>in vitro</i> .....	24

▪ Vitrificación.....	25
▪ Calentamiento.....	26
▪ Recuento celular: Tinción nuclear con bisbencimida.....	27
▪ Diseño experimental.....	28
▪ Análisis estadístico.....	28
➤ <u>RESULTADOS</u> .....	29
➤ <u>DISCUSIÓN</u> .....	31
➤ <u>CONCLUSIÓN</u> .....	35
➤ <u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	36

## **INTRODUCCIÓN**

El desarrollo alcanzado por las biotecnologías de la reproducción nos permite en la actualidad la obtención de embriones en la especie bovina por medio de dos técnicas: producción *in vivo*, a partir de hembras sometidas a tratamientos de multiovulación y posteriormente inseminadas y lavadas para la recuperación de embriones, e *in vitro*, a partir de ovocitos que son madurados, fecundados y cultivados en el laboratorio hasta que alcancen el estadio deseado para transferencia o criopreservación. En los últimos años, la producción de embriones *in vitro* se ha convertido en una técnica de uso habitual en ganadería bovina en algunos países, como es el caso de Brasil, Argentina y Canadá, ya que permite la producción de embriones de alto valor genético (Bruyère y cols., 2012) con resultados que mejoran los obtenidos con la producción de embriones *in vivo*, acelerando la mejora genética. Sin embargo, actualmente, en Europa esta técnica tiene un uso limitado.

El desarrollo de técnicas de criopreservación que posibilita la conservación de embriones durante largos periodos de tiempo sin pérdida de su viabilidad, ha permitido la comercialización de embriones a gran escala y ha supuesto una importante reducción de los costes de aplicación de estas tecnologías (Kim y cols., 2012; Morató y cols., 2012).

Los embriones tienen una elevada sensibilidad a la criopreservación, debido a sus características morfológicas, que los diferencian de otras estructuras (células, tejidos). Presentan diferente respuesta ante la presencia de los agentes crioprotectores (CPs), dada su naturaleza multicelular. El embrión se encuentra rodeado por una zona pelúcida, que actúa como una barrera fisiológica dificultando la difusión del medio de criopreservación, y además presenta una cavidad llena de fluido denominada blastocele. Para realizar una correcta criopreservación es necesario eliminar la mayor cantidad posible de agua del embrión (células y blastocele), y el grado de deshidratación será uno de los factores determinantes del éxito de la técnica (Morató y cols., 2012). Además, esta sensibilidad está influida por otros factores como son la especie, edad, calidad y estadio del embrión y el método de producción del mismo (Abdalla y cols., 2012; Morató y cols., 2012).

Los embriones producidos *in vitro* (EPIV) son de menor calidad que los producidos *in vivo* lo que determina menores tasas de preñez obtenidas tras la transferencia a hembras receptoras (Rizos y cols., 2008). Aunque el mejor sistema para evaluar la calidad de un embrión es su capacidad para dar lugar a una gestación y al nacimiento de una cría viable, existen otros métodos que permiten valorar la calidad de los embriones.

El número de células y su diferenciación son también indicadores de calidad embrionaria. La tinción diferencial nos permite diferenciar y contar las células de la masa celular interna (MCI), a partir de las cuáles se desarrollará el feto, y las del trofotodermo, en la periferia del embrión, que darán lugar a los anejos fetales. Aunque los EPIV tienen un número similar de células totales que los obtenidos *in vivo*, el número de células de la MCI y la ratio MCI/células totales son más bajos en los EPIV.

Otro indicador útil para la valoración de la calidad embrionaria es el grado de apoptosis o muerte celular autodirigida. La apoptosis es un procedimiento fisiológico de eliminación de células degeneradas, sin embargo, altas tasas de apoptosis pueden comprometer la viabilidad embrionaria. Para su valoración, actualmente se dispone de dos técnicas que nos permiten observar la fragmentación del ADN o la identificación de las proteínas que regulan la apoptosis. Aunque se trata de un fenómeno presente tanto en los embriones producidos *in vivo* como en los producidos *in vitro*, en los segundos existe un mayor porcentaje de células apoptóticas en la MCI.

Tanto el número de células del embrión, como los índices de apoptosis pueden tener repercusiones sobre su capacidad de supervivencia a la criopreservación y, consecuentemente, sobre las tasas de gestación tras la transferencia de los embriones a las receptoras.

Los embriones pueden criopreservarse por dos métodos: congelación lenta (o clásica) o por vitrificación. En el caso de los EPIV la vitrificación se impone a la congelación lenta como método de criopreservación, gracias a sus mejores resultados. El mayor daño celular durante la criopreservación se debe a la formación de cristales de hielo intracelular que sucede al someter al embrión al proceso de congelación lenta. La vitrificación permite solidificar células sin que se produzca esa cristalización, creando un estado similar al vidrio (Kim y cols., 2012).

Desde la primera aplicación de la vitrificación en embriones de ratón y vaca, la técnica ha experimentado grandes mejoras, tras la introducción de soportes de mínimo volumen que permiten aumentar la velocidad de enfriamiento y calentamiento (*Kim y cols., 2012*).

Sin embargo, uno de los problemas que presenta la vitrificación es la necesidad de realizar múltiples pasos para eliminar los CPs del embrión antes de poder transferirlo a la hembra receptora. Hay que tener en cuenta que se trabaja en condiciones de campo, en las que no se dispone de un laboratorio para poder realizar el protocolo de calentamiento en las condiciones que proporcionan óptimos resultados de supervivencia. Por ello, sería necesario buscar un sistema que permita una aplicación directa, similar a la utilizada en la inseminación artificial o en la transferencia directa de embriones congelados en etilenglicol (*Akiyama y cols., 2012*). En los últimos años, se han realizado numerosos estudios en busca de un sistema de vitrificación/calentamiento que permita realizar la eliminación de los crioprotectores en la propia pajuela (*in-straw*). Sin embargo, las experiencias a nivel de campo son reducidas, debido a la complejidad de los experimentos y a su carestía.

## **Crioprotectores: Elección del más adecuado**

Los CPs son moléculas que se emplean en la criopreservación para evitar las lesiones causadas por la misma. Pueden clasificarse en dos tipos: permeables y no permeables:

- Permeables: es el caso de etilenglicol (EG), el propilenglicol y el dimetilsulfóxido (DMSO). Realizan su función entrando en la célula y reemplazando el agua intracelular, modificando sus características físico-químicas y su respuesta ante el descenso de la temperatura. Sus mecanismos de acción son:
  - Disminución del punto de congelación de la suspensión.
  - Impiden la formación de hielo, al disminuir la velocidad de crecimiento de cristales y la modificación de su forma.
- No permeables: se encargan de reducir el agua intracelular por efecto osmótico. Cuando se pone en contacto una célula con una solución que presente una elevada concentración de los mismos, esta responderá deshidratándose para contrarrestar la diferencia de presión osmótica. Se clasifican a su vez en dos tipos:
  - Bajo peso molecular: mono y disacáridos como la sucrosa (el más empleado actualmente), trehalosa, glucosa y galactosa.
  - Alto peso molecular: polímeros como el polivinilalcohol, polietilenglicol, Ficoll y la polivinil pirrolidona.

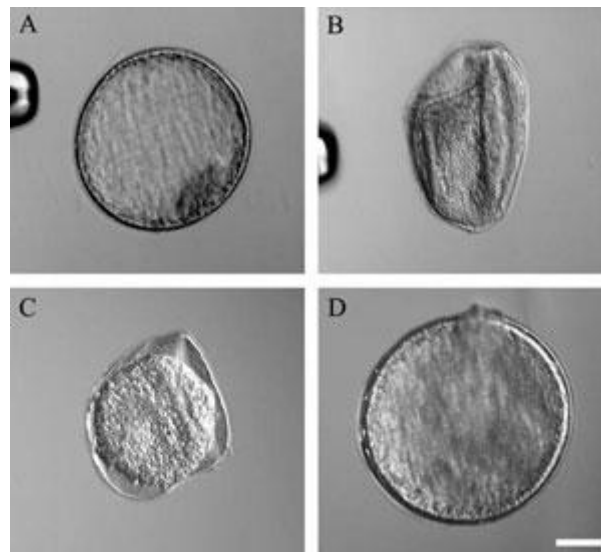
El CP empleado debe ser lo menos tóxico posible para los embriones. Hay que tener en cuenta que la toxicidad es temperatura-dependiente, especialmente en los CPs permeables, por lo que la temperatura debe ser un factor a considerar en los ensayos de toxicidad de los CPs. (*Ali y Shelton, 2007*)

Para disminuir los efectos tóxicos de las soluciones de vitrificación, se emplean varias estrategias (*Vajta, 2006*):

1. Empleo de CPs de baja toxicidad y alta permeabilidad: es el caso de EG, cuyo uso se ha extendido en prácticamente todas las especies.



2. Utilización de dos o, más frecuentemente, tres CPs. Estas asociaciones deben estudiarse previamente, para evitar que los agentes empleados muestren efecto sinérgico y la toxicidad se multiplique. En el caso de los embriones bovinos, la combinación de EG con DMSO en presencia de sucrosa, es la mezcla de elección, ya que la permeabilidad de la misma es superior a la de los componentes individualmente. También se pueden hacer asociaciones de más de tres CPs, pero requieren aún más estudio.
3. Adición de los CPs por pasos, en soluciones de concentración ascendente. Los métodos recientes, además, se centran en buscar el menor tiempo de exposición posible a los CPs, dependiendo del tipo de muestra.
4. Disminución de la temperatura durante la exposición del embrión a la solución final de vitrificación (concentración más elevada de CPs). Este procedimiento podría ser útil pero existe el riesgo, aun no comprobado, de que se produzcan lesiones por frío.



**Ilustración 1. Respuesta de un embrión a la exposición a las soluciones de vitrificación. A: embrión en solución isosmótica. B: embrión en solución hiperosmótica, pierde agua intracelular por acción CPs no permeables. C: entrada en el embrión de CPs permeables. D: embrión con CPs reemplazando el agua intracelular (*Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University*)**

## Historia de la vitrificación

Hoy en día *Basile J. Luyet* es considerado como el padre de la vitrificación. Aunque ya en 1860, *Edward W. Brayley* propuso la posibilidad de vitrificar agua, y *Walter Stiles* en 1930 sugirió la vitrificación como estrategia para la criopreservación.

*Luyet* fue quien realmente desarrolló este sistema, dedicando dos décadas de su vida a su estudio. Estableció los factores de los que depende, dos intrínsecos a la muestra (velocidad de cristalización y tamaño) y uno extrínseco (velocidad de enfriamiento), y comenzó a realizar deshidrataciones del material a vitrificar mediante la breve exposición del mismo a EG y glicerol.



Ilustración 2. Profesor Luyet, hacia 1970 (Schmidt, 2006)

Abandonó sus investigaciones acerca de este tema tras la refutación de sus teorías al demostrarse la presencia de cristales de hielo en sus experimentos. Sin embargo, mientras se dedicaba al estudio de la relación entre la hemólisis y la formación de hielo, consiguió, por accidente, vitrificar células sanguíneas.

A *Luyet* le siguieron años más tarde, múltiples investigadores, destacando entre ellos *Tokio Nei*, que vitrificó glóbulos rojos en una solución al 30% de glicerol con una tasa de enfriamiento de  $10^5$ °C/min (*Nei*, 1976), y *Brügeller* y *Mayer*, quienes realizaron la primera demostración reproducible de vitrificación de agua pura y de una solución 0,1 M de  $\text{CuCl}_2$  (*Brügeller* y *Mayer*, 1980).

En 1985, *Rall* y *Fahy* realizaron la primera vitrificación de embriones de ratón en estado de 8 células (*Rall* y *Fahy*, 1985).

## **Características Generales**

Desde el punto de vista de la física, la definición de vitrificación es la solidificación de una solución a bajas temperaturas sin formación de cristales de hielo. Podría considerarse como un aumento extremo de la viscosidad (*Vajta*, 2000). El nombre hace referencia a la apariencia macroscópica que toma dicha solución, permaneciendo clara y transparente, en estado vítreo. Aunque este método evita en gran medida la formación de hielo intracelular y las lesiones derivadas, la vitrificación tiene otros efectos negativos que deben ser evaluados antes de optar por uno u otro sistema (*Vajta* y cols., 2006).

Para alcanzar el estado vítreo se requiere someter a la muestra a velocidades de enfriamiento muy elevadas y ha de ser expuesta a concentraciones de CPs, muy superiores a las empleadas tradicionalmente en la congelación lenta. Los CPs permiten que la solución adquiera una mayor viscosidad durante el enfriamiento, retrasando con ello la capacidad de reordenamiento de las moléculas del agua y disminuyendo su capacidad de formar cristales de hielo. Además, la tasa de enfriamiento rápida hace que disminuya bruscamente el movimiento molecular de manera que estas moléculas no tengan tiempo de ordenarse y orientarse de acuerdo a sus cargas, por lo que se formará una masa amorfa (*Kim* y cols., 2012).

Así, se deberá establecer un sistema que permita alcanzar tasas de enfriamiento máximas y seguras, combinado con la minimización del efecto tóxico causado por las altas concentraciones de CPs (*Vajta* y *Nagy*, 2006).

A grandes rasgos el proceso de vitrificación se podría resumir de la siguiente manera:

- Exposición del material a criopreservar (ovocitos, embriones) a soluciones de vitrificación con concentraciones ascendentes de CPs, disueltos en un buffer en presencia o no de CPs no permeables. La última solución, con la concentración de CPs más elevada podrá oscilar entre 5-7M (*Vajta*, 2013).
- Envasado del material a vitrificar en dispositivos apropiados.

- Descenso ultrarrápido de la temperatura. Este paso se realiza generalmente exponiendo la muestra directamente al nitrógeno líquido (*Vanderzwalmen y cols., 2012*).

Se puede hablar de dos tipos de vitrificación distintos. Por un lado está la vitrificación clásica, que emplea una pajuela de 0,25 ml como dispositivo de almacenamiento, también utilizado en la técnica de congelación lenta. Por otra parte, en la última década se ha desarrollado un nuevo concepto de vitrificación empleando el mínimo volumen de solución posible para acelerar la tasa de enfriamiento mediante el empleo de dispositivos adecuados para ello. Este último procedimiento se conoce como vitrificación ultrarrápida.

#### → Vitrificación clásica

Los primeros experimentos de vitrificación realizados con embriones bovinos, empleaban el mismo dispositivo de almacenaje que el empleado para la congelación lenta, es decir, pajuelas de plástico de 0,25 ml. Para obtener las tasas de enfriamiento indispensables para conseguir el estado vítreo, éstas eran introducidas directamente en el nitrógeno líquido. Mediante este procedimiento se obtenían velocidades de enfriamiento de, aproximadamente, 2.500°C/min (*Vajta y cols., 1998*).

Sin embargo, las características de estas pajuelas han resultado ser un impedimento para que el intercambio de temperaturas sea suficientemente rápido. La necesidad de introducir cantidades de solución de vitrificación relativamente altas (>5 µl), requeridas para formar una columna estable de medio, y las paredes gruesas de las mismas, actúan como aislante térmico, alejando la muestra biológica de la fuente de frío, o de calor en el caso del calentamiento. Además, los cambios de presión extremos inducidos por la inmersión en el nitrógeno líquido de un sistema cerrado, provocan en muchos casos que, aun estando intactas, las pajuelas estallen y se pierda con ello la muestra que se pretende vitrificar.

Para mejorar este sistema, *Vajta* desarrolló un dispositivo denominado *Open-pulled straw* (OPS) (Ilustración 2), que consiste en una pajuela de 0,25 ml estirada por efecto del calor hasta conseguir que el diámetro interno y el grosor de su pared disminuyan hasta 0,8 y 0,7 mm respectivamente. El embrión se carga colocando el

extremo abierto del OPS sobre la gota de medio, que entrará en el mismo por capilaridad con un volumen de, aproximadamente 2-6  $\mu\text{l}$ . Gracias a este sistema se alcanzan tasas de enfriamiento de hasta 16.000°C/min (*Vajta y cols., 1998; Kuwayama y cols., 2005*).

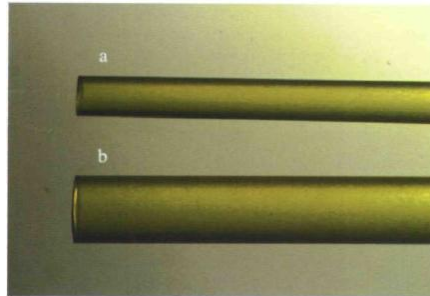


Ilustración 3. OPS (a) con un diámetro aproximadamente un 50% inferior a la pajuela de 0,25 mL convencional (b)

### → Vitricificación ultrarrápida

Debido a las limitaciones del sistema de vitricificación en pajuela, comenzaron a desarrollarse dispositivos que favorecieran el intercambio térmico, incrementándose, tanto las velocidades de enfriamiento como las de calentamiento. En 1996, *Martino y cols.*, describieron un sistema de vitricificación para ovocitos bovinos basado en la utilización de una gradilla de cobre de microscopía electrónica, que permitía conseguir tasas de enfriamiento superiores a las obtenidas mediante la vitricificación clásica, mejorando de forma significativa la tasa de supervivencia de los ovocitos (*Mukaida y cols., 2002*).

En consecuencia, comenzó a estudiarse esta posibilidad, utilizando diversos dispositivos que mejoraran las características del anterior. Algunas técnicas se basaban en el contacto directo de la muestra con el nitrógeno líquido mediante la inmersión en el mismo de una gota de medio conteniendo al ovocito/embrión. Este proceso presentaba muchos inconvenientes, incluyendo el riesgo de contaminación, que se puede evitar utilizando nitrógeno líquido estéril. Pero el principal problema que había era que la cantidad de medio necesaria para la formación de una gota es relativamente grande (5-6  $\mu\text{l}$ ) y además, antes de sumergirse la misma en el nitrógeno líquido, se mantiene un corto periodo de tiempo flotando en él, reduciendo considerablemente la tasa de enfriamiento (*Vajta, 2000*).

Se consideró que este problema podría solucionarse con el empleo de otros soportes que pudieran mantener volúmenes mínimos de medio conteniendo la muestra. De los disponibles actualmente, cabe destacar:

- *Cryoloop*: se trata de un pequeño bucle de *nylon* de 20  $\mu\text{l}$  de ancho y con un diámetro de 0,5-0,7 mm montado en un tubo de acero inoxidable, que permite manejarlo a bajas temperaturas. De esta manera se formará una fina película de medio conteniendo la muestra. Una vez realizada la vitrificación, se conserva en un criotubo abierto que permite la circulación del nitrógeno líquido. La tasa de enfriamiento máxima obtenida con este dispositivo es de 32.000°C/min (*Mukaida y cols., 2002*) (Ilustración 3).



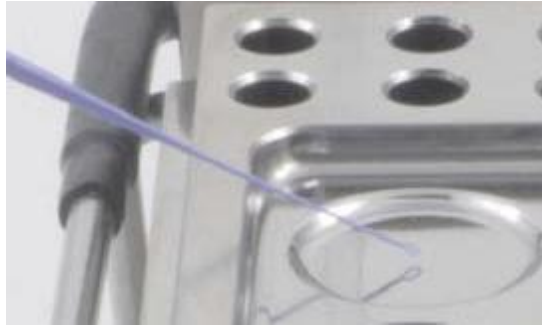
Ilustración 4. Blastocistos en el lazo con una fina capa de solución (*Mukaida y cols., 2003*)

- *Cryotop*: está formado por una película de polipropileno unido a un mango de plástico y con una pajuela para cubrirlo y aislarlo una vez contenga el material vitrificado. Los embriones se cargan sobre la película y el medio se aspira casi en su totalidad quedando un volumen inferior a 0,1  $\mu\text{l}$ , tras lo cual se sumerge en el nitrógeno líquido directamente y se cubre con la funda. Las tasa de enfriamiento puede alcanzar 42.100°C/min (*Kuwayama, 2007; Cobo y cols., 2008*) (Ilustración 4).



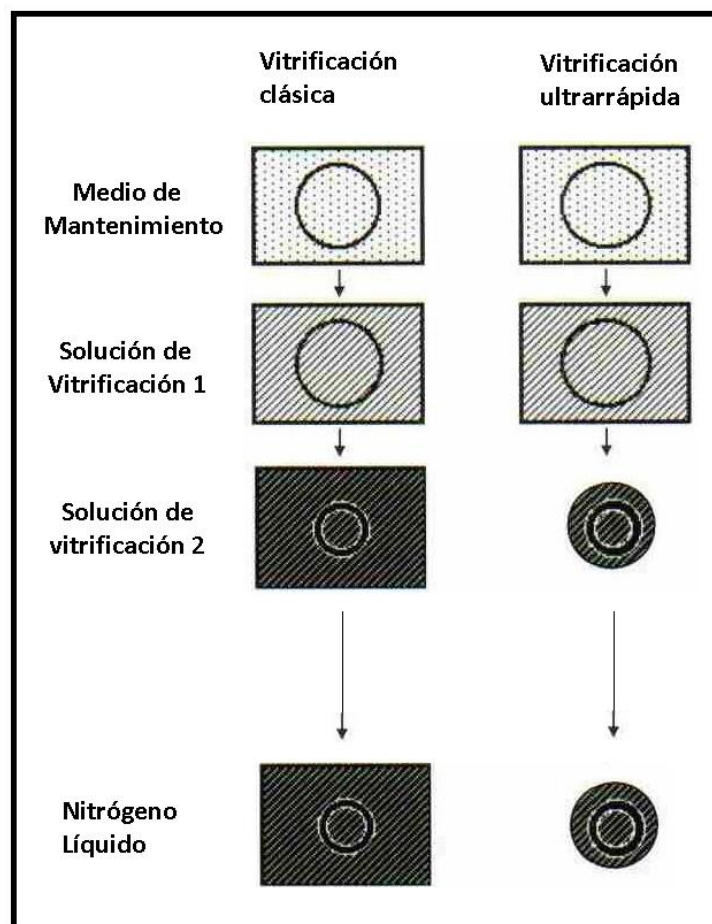
Ilustración 5. *Cryotop* (*Kuwayama y cols., 2005*)

- *Fibreplug*: estructura de fibra con un gancho en la parte final. Permite emplear un volumen de medio mínimo de 0,5  $\mu\text{l}$ /embrión. Se alcanzan velocidades de enfriamiento de 40.000°C/min (*Criado-Scholz, 2012*) (Ilustración 5).



**Ilustración 6. Fibreplug (Current Frontiers in Cryopreservation, Katkov)**

Estos dispositivos han permitido reducir el tiempo de exposición a la solución final de vitrificación (y la más tóxica, al tener la mayor concentración de CPs), gracias al aumento de la velocidad de enfriamiento.



**Ilustración 7. Representación de un embrión (círculo) durante vitrificación clásica y vitrificación ultrarrápida. La concentración de CP en solución se muestra por la oscuridad del sombreado. (Modificado de Mukaida y cols.,**

**2003)**

## → Calentamiento

En la vitrificación, el proceso de calentamiento es tan importante como el de enfriamiento. Si no se realiza correctamente se produce el fenómeno denominado "desvitrificación" que se traduce en la formación de cristales de hielo. El calentamiento debe desarrollarse rápidamente, para lo cual, las muestras se sumergen de forma casi inmediata en soluciones de calentamiento (entre 39-41°C) para que el intercambio de temperatura suceda lo más rápido posible (*Vajta y Nagy, 2006*).

Dadas las altas concentraciones de CPs empleados, es necesario realizar un proceso de eliminación y de rehidratación celular. Para conseguirlo, generalmente se realiza un calentamiento en varias etapas, mediante el cual se somete al material biológico criopreservado a soluciones con concentraciones decrecientes de CPs no permeables que, por efecto osmótico, favorezcan la salida de los CPs intracelulares, evitando los bruscos intercambios de agua. Un protocolo comúnmente empleado utiliza la sucrosa como CP no permeable, en dos soluciones con concentraciones de 0,25 y 0,15 M respectivamente, para finalmente pasar la muestra por una solución sin sucrosa (*Vajta y cols., 1999; Gómez y cols., 2009*).

Se recomienda mantener las muestras vitrificadas a temperatura ambiente durante 3 segundos antes de sumergirlas en la solución de calentamiento (39-41°C), para evitar roturas de la zona pelúcida (*Vajta y Nagy, 2006*).

Las velocidades de calentamiento obtenidas con el empleo de los dispositivos de almacenamiento mencionados son (*Díez, 2012*):

- Pajuela clásica: 1.300°C/min.
- OPS: 13.900°C/min.
- *Cryoloop*: 21.000°C/min.
- *Cryotop*: 23.000°C/min.
- *Fibreplug*: 20.900°C/min.



## **Daños durante la vitrificación**

Antes de centrarnos en las posibles lesiones producidas durante la vitrificación, es necesario conocer los daños que produce la criopreservación en general. Podemos hablar de tres tipos de daño en tres rangos de temperatura diferentes:

- De +15°C a -5°C: las lesiones por enfriamiento. Implican cambios en ciertas estructuras como gotas lipídicas, membranas ricas en lípidos y estructuras como microtúbulos y microfilamentos del citoesqueleto. Se trata de alteraciones parcialmente irreversibles y a las que los embriones bovinos son relativamente resistentes.
- De -5°C a -80°C: los daños ocurren sobre todo en el rango de -5°C a -40°C. Es el momento en el que ocurre la formación de hielo extra e intracelular, ya indicada anteriormente como la mayor fuente de lesión. Producen efectos deletéreos, mayormente mecánicos, sobre todas las estructuras.
- De -50°C a -150°C: debido al efecto mecánico de la solución solidificada, hay un elevado riesgo de rotura de la zona pelúcida (ZP).

La fase de almacenamiento a temperaturas inferiores a -150°C (normalmente a -196°C) es la menos peligrosa, sin embargo, el calentamiento accidental durante la misma es una de las causas más frecuentes de daños, por lo que el manejo de las muestras una vez introducidas en el nitrógeno líquido debe ser especialmente cuidadoso para que no se pierda la cadena de frío.

Además, cuanto más pequeña es la muestra, más posibilidades de supervivencia presenta, característica que concede cierta ventaja a los embriones en estadio de blastocisto, formados por células muy pequeñas, frente a los ovocitos, cigotos y embriones en estadios tempranos.

La vitrificación presenta múltiples ventajas frente a la congelación lenta, como es la eliminación total de cristales de hielo intracelulares y la supresión de las lesiones por enfriamiento al reducir casi en su totalidad la fase de descenso de temperaturas entre +15°C y -5°C.

Sin embargo, presenta como inconveniente el riesgo de transmisión de enfermedades a través del nitrógeno líquido y su posible efecto en las receptoras y la futura cría. La posibilidad de infección y el desarrollo de las técnicas reproductivas actuales están inevitablemente relacionados, ya que protocolos como la recolección de semen y de embriones, no se realizan en condiciones totalmente estériles. Se trata de un riesgo teórico y es muy discutido ya que nunca ha sido probado. Se han realizado cientos de miles de transferencias de embriones y ninguna de ellas ha resultado en infección (*Vajta y cols.,2006*). Sin embargo, este riesgo es uno de los principales argumentos esgrimidos en contra de este procedimiento.

Los dispositivos de almacenamiento utilizados en este sistema se caracterizan por eliminar las barreras entre la muestra y la fuente de frío, pero con ello también eliminan la protección. *Bielansky y cols. (2000)* demostró experimentalmente la posibilidad de infección de embriones a través de nitrógeno líquido contaminado con BVDV (*Bovine Viral Diarrhea Virus*), y BHV-1 (*Bovine Herpesvirus-1*) en muestras no selladas. Es por esto que se han desarrollado nuevos sistemas y dispositivos que permiten mantener unas condiciones asépticas. Se buscan formas de mantener las muestras aisladas, realizando modificaciones de dispositivos ya existentes o almacenando los mismos, conteniendo la muestra, en pajuelas u otros dispositivos que garanticen el aislamiento del exterior.

En otras áreas de la medicina humana se ha probado la transmisión de agentes infecciosos a través del nitrógeno líquido, pero hay que tener en cuenta que las muestras empleadas fueron de un tamaño  $10^3$ - $10^4$  veces superior que el material biológico empleado en embriología (muestras de sangre), lo que podría explicar la diferencia (*Vajta y cols., 2006*).

*Bielanski y Vajta (2009)* contemplan una serie de medidas preventivas para evitar en la medida de lo posible la transmisión de infecciones durante el proceso de vitrificación y el almacenamiento de embriones: (i) conservar la integridad de la ZP que supone una importante protección para el embrión; (ii) realización de múltiples lavados previos, permitiendo una importante disminución de los agentes infecciosos que la muestra pudiera contener (normativa IETS); (iii) cargado y sellado correcto del dispositivo de almacenamiento evitando el contacto directo con el nitrógeno líquido, y

(iv) trabajar con la máxima esterilidad posible tanto del propio nitrógeno líquido como del contenedor en el que se almacenarán las muestras.

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

El objetivo de este trabajo fue la adaptación de un método de vitrificación/calentamiento (*Fibreplug*) que permitiera realizar la transferencia directa de los embriones vitrificados en las explotaciones. Para ello, se analizaron tres sistemas de calentamiento en paso único, uno convencional (control) y dos modificados, y su efecto sobre la supervivencia embrionaria (re-expansión y eclosión) y el número de células totales en los embriones eclosionados tras el tratamiento.

Nuestra hipótesis es que el calentamiento de EPIV bovinos en un solo paso puede realizarse directamente en la pajuela que se va a emplear para la transferencia de embriones, sin que se produzca pérdida de la viabilidad embrionaria, y permitiendo, por tanto, la adecuación del procedimiento a las condiciones de campo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Salvo que se indique lo contrario, todos los productos químicos y los reactivos utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid). Los medios de cultivo fueron elaborados con agua Milli-Q (Tipo 1).

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

#### **→ Obtención y maduración de ovocitos**

Para la recolección de ovocitos se emplearon ovarios de vacas sacrificadas en el Matadero Central de Asturias, conservados en solución salina (NaCl 9 g/mL) con antibióticos (penicilina, 100 UI/mL y sulfato de estreptomicina, 100 mg/mL) a 25-30°C hasta la colecta de complejos *cumulus*-ovocito (CCOs). A su llegada al laboratorio, los ovarios fueron lavados para la eliminación de los restos de sangre, y dispuestos en vasos de precipitado con solución salina fresca, a 30°C.

Se aspiró el contenido de los folículos visibles de 3 a 7 mm de diámetro, por medio de una aguja de 18 G conectada a una jeringuilla de 10 mL; el medio colectado se recogió en un tubo *Corning*<sup>®</sup> de 50 mL con medio de mantenimiento (MM), que consistió en *Tissue Culture Medium 199* (TCM199<sup>®</sup> *Invitrogen*, Barcelona), 25 mM HEPES y Albúmina Sérica Bovina (*Bovine Serum Albumine* -BSA-) 0,4 g/L. El sedimento del líquido folicular aspirado formado, se recogió con una pipeta *Pasteur* de vidrio y se depositó en una placa de Petri de 90 mm con MM, para la búsqueda de los CCOs con la ayuda de un estereomicroscopio a 20x. Solo se seleccionaron para la maduración aquellos ovocitos que presentaran un *cumulus oophorus* compacto, con un citoplasma homogéneo y rodeados por, al menos, tres capas de células de la granulosa (60x).

Tras un triple lavado en MM, los ovocitos seleccionados se lavaron dos veces en placas de Petri de 35 mm con medio de maduración (MIV; TCM 199<sup>®</sup> NaHCO<sub>3</sub> (2,2 g/L), suero fetal bovino (*Fetal Calf Serum* -FCS-; 10% v:v), FSH porcina (1 µg/mL), LH (5 µg/mL) y 17 β-Estradiol (1 µg/mL)). La maduración se llevó a cabo en placas de cuatro pocillos (placa 4-*Well*) con 500 µL de medio de maduración/pocillo, conteniendo entre 35 y 40 ovocitos. Se incubaron a 39°C, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y con humedad saturada durante 22-24 horas.

## → Fecundación *in vitro*

La separación del semen fue llevada a cabo mediante el procedimiento *swim-up* descrito por *Parrish* y cols. (1986). El semen a utilizar, procedente de un eyaculado del único toro y congelado en pajuelas, se descongeló exponiendo la pajuela 5 segundos al aire e introduciéndola en un baño de agua a 37°C durante 30 segundos. El contenido de la pajuela se añadió a un tubo de poliestireno que contenía 1 mL de medio de *Swim-up* (*Sperm-TALP*) (Tabla 1), previamente equilibrado, a razón de 170 µL por cada tubo. Se mantuvo durante una hora a 39°C, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y con humedad saturada.

Tabla 1. Composición medio *Sperm-TALP*

Componente	Concentración
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

Transcurrido el tiempo indicado, se aspiró el sobrenadante (700-800µL), que contenía los espermatozoides motiles, y se centrifugó durante 7 minutos a 200 x *g*. Se retiró el sobrenadante y se obtuvo un pellet de un volumen de, aproximadamente, 100 µL, a partir del que se determinó la concentración espermática en hematocitómetro.

Tras la maduración *in vitro*, los CCOs se lavaron dos veces en MM y otras dos veces en medio de fecundación (medio *Fert-TALP*) (Tabla 2) previamente equilibrado, suplementado con heparina (20 µg/mL), PHE (40 µL/mL) y se depositaron en pocillos de una placa 4-well, con 500µL de medio de fecundación en cada pocillo, a razón de 80-100 ovocitos/pocillo.

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

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

Antes de la puesta en contacto de los espermatozoides con los CCOs maduros, se verificó que su viabilidad y motilidad fueran adecuadas, por medio de una observación entre porta y cubre. Se añadieron los espermatozoides a una concentración de  $2 \times 10^6$  células/mL de medio de fecundación.

La fecundación se completó incubando los ovocitos y los espermatozoides juntos durante 18-20 horas a 39°C en un atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y humedad saturada.

## → Cultivo *in vitro*

Los presuntos cigotos fueron sometidos a una agitación en un tubo *Corning*<sup>®</sup> de 15 mL con MM (2 mL) y empleando un vórtex, durante 2 minutos, para separar las células del *cumulus* y los espermatozoides sobrantes. Después se lavaron 3 veces en MM y dos en el medio de cultivo, denominado Fluido Oviductal Sintético (*Synthetic Oviductal Fluid* -SOF-) suplementado con 6g/L de BSA (SOF-6) (Tabla 3) (Holm y cols., 1999).

Tabla 3. Composición 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
Mio-inositol	2,77 mM
Rojo Fenol	10 µg/mL

Los presuntos cigotos se cultivaron en microgotas de SOF-6 (50 µL), cubiertas con aceite mineral que se prepararon previamente y se equilibraron durante 2 horas antes de añadir los cigotos (entre 35 y 40 por cada gota). El cultivo se llevo a cabo a 39°C, en



atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 5% de O<sub>2</sub>. Las renovaciones de medio se realizaron en los días 3 y 6 tras las puesta en cultivo y se analizó el desarrollo embrionario en los días 3, 6, 7 y 8.

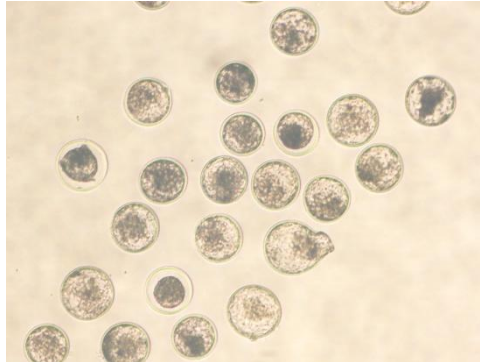


Ilustración 8. Blastocistos bovinos producidos *in vitro* en día 7 aptos para criopreservación.

### Vitrificación

Blastocistos de día 7 y 8, de calidad excelente y buena se vitrificaron por medio del *Cryologic Vitrification Method* (CVM) empleando las soluciones descritas por *Vajta* y cols. (1998). El dispositivo de almacenamiento empleado fue el *Fibreplug*:

- **Grupo Control:** *Fibreplug* convencional. Se almacena en nitrógeno líquido incluido en la pajuela desarrollada para el sistema.
- **Método Experimental 1:** *Fibreplug* modificado. El gancho del final se recorta ligeramente, sin llegar a eliminar el acodamiento y se afina la porción superior de su cuello, disminuyendo el diámetro, para que quepa en pajuelas de transferencia de embriones (0,25 mL), cuyo diámetro es inferior a los que incorpora el *Fibreplug*. El embrión vitrificado se almacenará en una pajuela de 0,25 mL, cargada con una columna de 7 mm de medio de calentamiento (MC) compuesto por TCM 199 Hepes, 20% FCS y sucrosa 0,25 M), seguida de 1 cm de aire y una última columna de 6 cm de MC.



Ilustración 9. A: *Fibreplug* Grupo Control (Sin modificar). B: *Fibreplug* Grupo Experimental 1 (modificado)

- **Método Experimental 2:** *Fibreplug* modificado 2. Únicamente lleva recortado ligeramente el gancho del final. Se almacena en nitrógeno líquido incluido en la pajuela habitual, de forma similar al grupo control.

Sobre una placa calefactada a 41°C los embriones se lavaron dos veces en medio de mantenimiento de vitrificación (MMV) que está compuesto por TCM 199 HEPES y FCS al 20% y se incubaron en dos soluciones de vitrificación con CPs en concentración ascendente: en la primera, VS1 (MMV + 7,5% EG + 7,5% DMSO), se mantuvieron durante 3 minutos, y en la segunda, VS2 (MMV + 16,5% EG + 16,5% DMSO), 25 segundos. Seguidamente se colocaron los blastocistos, de uno en uno, en cada uno de los 3 tipos de *Fibreplug*, en un volumen de 1 µL de medio, se vitrificaron por contacto directo con un bloque de acero (bloque *Cryologic*) superenfriado en una caja de poliexpán llena de nitrógeno líquido, y se introdujeron en el envase correspondiente a cada método, previamente enfriado.

### Calentamiento

Según lo indicado anteriormente, se establecieron 3 grupos experimentales:

- **Grupo Control:** se realizó una única incubación sumergiendo el *Fibreplug* convencional en un pocillo de la placa 4-well que contenía 1 mL de MC.
- **Método Experimental 1:** la incubación se realizó en la propia pajuela en la que fue conservado el embrión desde el momento de su vitrificación.

La pajuela con el *Fibreplug* modificado 1 se mantuvo 3 segundos al aire y seguidamente se introdujo en agua a 41°C durante 10 segundos, para lograr la descongelación del MC que contenía. Una vez fuera del agua, se empujó el tapón de algodón de la pajuela hasta que el medio hubo contactado con el gancho del *Fibreplug* y se introdujo de nuevo en el agua a 41°C durante 5 minutos. Tras la incubación, se retiró el *Fibreplug* con un ligero movimiento de rotación, quedando el embrión en el interior de la pajuela.

- **Método Experimental 2:** se realizó la incubación directamente en una pajuela de 0,25 mL cargada con una columna de 1 cm de MC, seguida de otra columna de 1 cm de aire y una última columna de MC, hasta rellenar la pajuela en su totalidad. Las pajuelas se mantuvieron en agua a 41°C. En el momento del calentamiento, tras dejar el *Fibreplug* 3 segundos al aire, se introdujo en la pajuela conteniendo el MC. Se mantuvo durante 5 minutos y se extrajo el *Fibreplug* con un ligero movimiento de rotación.

Tras los 5 minutos de incubación, se recuperaron los embriones de los 3 grupos experimentales, y se cultivaron en microgotas de SOF-6 + 10% de FCS durante 48 horas a 39°C, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 5% N<sub>2</sub> y humedad saturada. 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.

### **Recuento celular: Tinción nuclear con bisbencimida**

Los blastocistos eclosionados después de la calentamiento se fijaron en una solución de paraformaldehído al 0,4%. Después de un doble lavado en PBS-PVA (polivinilalcohol), se incubaron en una solución de bisbencimida (25 µg/mL) durante 3 minutos. Tras otro lavado en PBS-PVA, se montaron entre porta y cubre en una solución de montaje y se observaron al microscopio de fluorescencia con un filtro de rango 420 nm.

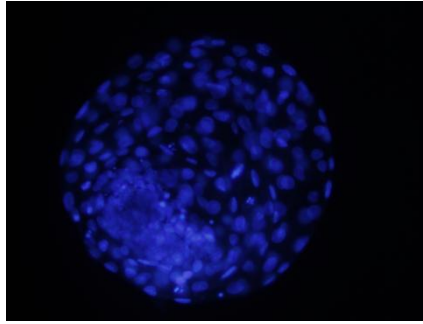


Ilustración 10. EPIV vitrificado en día 8 por el método experimental 2, a las 48 horas de cultivo tras el calentamiento

### **Diseño experimental**

Se estudiaron 3 protocolos de calentamiento en un único paso. Se analizaron los porcentajes de supervivencia (contando el número de blastocistos re-expandidos) transcurridas 2, 24 y 48 horas después del calentamiento y, los porcentajes de eclosión, a las 24 y 48 horas. Por otro lado se analizó el efecto de los protocolos indicados sobre la calidad de los embriones realizando el recuento de sus células totales.

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron por el procedimiento general de modelos lineales de SAS (*General Lineal Models*, GLM; SAS, 1999) y el test de Duncan para las diferencias de las medias ( $P < 0,05$ ). Los valores se expresaron como Medias de Mínimos Cuadrados  $\pm$  Error estándar (*Least Square Means  $\pm$  Standard error*, LSM  $\pm$  SE). Los efectos analizados fueron el protocolo de calentamiento y la edad de los blastocistos en el momento de la vitrificación.

## **RESULTADOS**

- Efecto del protocolo de calentamiento sobre la supervivencia de EPIV bovinos.

Se vitrificó y calentó un total de 76 embriones bovinos en 3 réplicas. De éstos se desestimaron los resultados obtenidos para el método experimental 1, debido a las elevadas tasas de degeneración. En la tabla se muestra, por tanto, el análisis estadístico de los resultados obtenidos en protocolos de calentamiento de embriones relativos al grupo control y grupo experimental 2. Estos suman un total de 67 embriones vitrificados y calentados. La edad del embrión (día 7 u 8) no tuvo efecto sobre los porcentajes de supervivencia, por lo que se presentan los datos agrupados.

**Tabla 4. Efecto del protocolo de calentamiento sobre la supervivencia de embriones bovinos producidos in vitro y vitrificados por la técnica CVM (control) y la técnica modificada (Exp)**

Grupo	N	R	2h	24h		48h	
			%RE	%RE	%EC	%RE	%EC
Control	34	3	67,94±8,1	70,43±9,6	53,94±11,1	70,43±9,6	70,05±16,4
Exp	33	3	65,08±7,8	73,42±8,5	29,64±9,8	73,41±8,5	67,46±14,5

N: número de embriones puestos en cultivo tras el calentamiento. R: réplicas de calentamiento. RE: reexpansión. EC: blastocistos eclosión. No hay diferencias significativas

Las tasas de supervivencia a las 2 horas post-calentamiento fueron de aproximadamente el 70%, manteniéndose sin apenas variaciones a las 48 horas. Respecto a los porcentajes de eclosión, aumentaron notablemente 48 horas después del calentamiento, en comparación con las tasas obtenidas a las 24 horas, alcanzando valores del 70%.

- Efecto del método de calentamiento sobre el número de células totales.

**Tabla 5. Efecto del protocolo de calentamiento sobre el número de células totales de los embriones bovinos producidos in vitro vitrificados por la técnica CVM (control) y la técnica modificada (Exp).**

Grupo	R	N	CÉLULAS TOTALES
Control	2	16	248,53±16,4
Exp	2	16	216,71±14,6

N: número de embriones puestos en cultivo tras el calentamiento. R: réplicas del calentamiento. No hay diferencias significativas

Se realizó el recuento de células totales de 32 embriones vitrificados y calentados en las dos últimas réplicas. No hubo diferencias significativas en el número de células de los embriones eclosionados de ambos grupos experimentales.

## **DISCUSIÓN**

En el presente estudio se vitrificaron con éxito embriones bovinos producidos *in vitro* en estadio de blastocisto expandido, empleando una modificación del CVM, que permitirá la transferencia directa de los embriones vitrificados sin manipulación por parte del técnico responsable de la transferencia.

El *Fibreplug* consiste en un gancho sobre el que se deposita la gota de medio de vitrificación conteniendo el embrión. En nuestro trabajo, los *fibreplugs* fueron modificados acortando el gancho de forma que permitiera vitrificar el embrión en el mínimo volumen posible, pero que pudiera ser introducido en una pajuela clásica de transferencia, cuyo diámetro es de 2 mm. Previamente, en el laboratorio se había comprobado que la exposición única de los embriones vitrificados a una solución de sucrosa 0,25 M durante 5 minutos (en lugar de la doble incubación tradicional) no afectaba a la supervivencia embrionaria (Trigal y cols., 2012a). Otros autores han confirmado recientemente este hecho (Morató y Mogas, 2013)

Una de las principales ventajas de la vitrificación frente a la congelación lenta es la reducción de costes ya que permite prescindir de equipamientos especializados como son los biocongeladores programables, de alto coste económico. Por otra parte, en el caso de la vitrificación, los protocolos de calentamiento tradicionales se realizan en varios pasos, con el fin de eliminar los CPs del espacio intracelular. Este hecho es el principal causante de la escasa difusión de esta técnica ya que, para llevarlo a cabo, se requiere personal especializado y una serie de infraestructuras no disponibles en las condiciones habituales de transferencia de embriones, por lo que cada vez se opta más frecuentemente por la transferencia directa de embriones congelados en EG.

Dado que los embriones producidos *in vitro* sobreviven mejor a la criopreservación por vitrificación, son muchos los grupos de investigación que han realizado estudios en busca de la simplificación de los pasos de calentamiento de los embriones vitrificados.

En nuestro estudio no se obtuvieron diferencias significativas en las tasas de re-expansión transcurridas 2, 24 y 48 horas tras el calentamiento y tampoco en las tasas de eclosión a las 24 y 48 horas entre los embriones calentados por el método directo

en la propia pajuela y los que fueron expuestos a la misma solución de calentamiento en un pocillo de una placa 4-well. La tasa de supervivencia se mantuvo en valores cercanos al 70% a lo largo de las 48 horas de cultivo post-calentamiento en los dos grupos analizados. Sin embargo, las tasas de eclosión aumentaron a las 48 horas, con relación a las registradas a las 24 horas post-calentamiento.

Nuestros resultados son algo inferiores a los obtenidos por *Inaba* y cols. (2011) que realizaron un estudio similar, empleando como dispositivo de almacenamiento el *Cryotop*. Si bien, la concentración de sucrosa empleada en la solución de vitrificación es algo superior a la empleada en nuestro estudio (0,3 M).

En un estudio realizado por *Vajta* y cols. (1999), se utilizó como dispositivo de almacenamiento el OPS. El protocolo de vitrificación se realizó en dos pasos exponiendo el embrión a una primera solución de vitrificación (EG y DMSO al 10%) durante 1,5 minutos, y durante 25 segundos, a una segunda solución con EG y DMSO al 20%. Al igual que en nuestro estudio, realizó el calentamiento en un pajuela precargada con una solución de sucrosa al 0,2 M y una incubación de 5 minutos. Aunque los porcentajes de supervivencia y de eclosión de su trabajo fueron superiores a los que nosotros obtuvimos, tampoco encontraron diferencias significativas entre el grupo control (embriones calentados en 0,8 mL de medio 0,2 M de sucrosa durante 5 minutos) y el grupo experimental de calentamiento *in-straw*.

Los resultados obtenidos por *Trigal* y cols. (2012b) en un estudio en el que se vitrificaron embriones bovinos siguiendo el mismo protocolo de vitrificación que en el nuestro y empleando la misma solución de calentamiento, presentan tasas de re-expansión superiores a las nuestras. Sin embargo, las tasas de eclosión resultan ser inferiores. La diferencia entre ambos estudios es que, el proceso de calentamiento no se realizó en la propia pajuela como en nuestro caso, sino en un pocillo de una placa 4-well, que es el equivalente a nuestro grupo control. No obstante el número de réplicas y de muestras empleadas en este estudio fueron muy superiores a las que se realizaron en el nuestro, lo cual podría explicar las diferencias encontradas.

En el caso de un estudio realizado por *Viera* y cols. (2007), en el que los embriones se almacenaron en micropipetas de cristal expuestas a una fuente de calor y estiradas hasta obtener un diámetro de 0,6 mm, las tasas de re-expansión tras 24



horas fueron superiores a las presentadas en este trabajo. Este estudio difiere del nuestro en el soporte empleado y en el protocolo de calentamiento que se realizó en dos pasos: primero se sumergió la micropipeta verticalmente, en un tubo con solución de calentamiento a 39°C de manera que se eliminaba el hielo y entraba parte de la solución en el dispositivo por capilaridad; seguidamente se introdujo la punta de la micropipeta conteniendo el embrión en una pajuela de 0,25 mL previamente cargada con la misma solución de calentamiento y, con la ayuda de una jeringa acoplada al extremo opuesto de la pajuela, se aspiró para asegurar la entrada de la muestra en la misma.

Para suprimir el paso de introducción del embrión en la pajuela utilizada para la transferencia, también se ha estudiado la posibilidad de vitrificar los embriones en la misma, realizando columnas de diferentes medios, de manera que, una vez calentado, solo sea necesario agitar la pajuela para que los medios se mezclaran e incubar unos minutos. Es el caso del estudio realizado por *Yang* y cols. (2007), en el que se vitrificaron mórulas de ratón producidas *in vivo* en una pajuela cargada con tres columnas diferentes de medio, una más grande con medio de sucrosa 0,5 M, seguida de solución de vitrificación y, finalmente, la misma solución de vitrificación conteniendo el embrión, separadas entre sí por burbujas de aire. Los resultados de re-expansión fueron muy elevados (93,7% de embriones incubados durante 5 minutos), aunque no se puede obviar el hecho de que tratamos con embriones de diferente especie animal, producidos *in vivo* y, por tanto, de una calidad muy superior a los que se emplearon en nuestro estudio, que siguieron un sistema de producción *in vitro*.

*Akiyama* y cols. (2012), en un estudio similar, vitrificaron embriones de bovino producidos *in vivo* en una pajuela cargada con 4 columnas de medio. Las dos de los extremos contenían la solución de calentamiento (5% EG y 0,15 M Sucrosa), mientras que, las centrales contenían la solución de vitrificación y una de ellas, el embrión. Tras el calentamiento, la supervivencia (re-expansión) de los embriones fue superior al 90%.

Sin embargo, los EPIV no presentan buenos resultados de supervivencia cuando se vitrifican con este tipo de protocolos. Así ocurrió en el estudio desarrollado por *Taniguchi* y cols. (2007), que usaba una pajuela precargada con medio de

calentamiento (sucrosa 1 M), seguido de dos columnas de solución de vitrificación más pequeñas, la última conteniendo el embrión. Las tasas de supervivencia a las 48 horas de cultivo fueron de aproximadamente el 65%, ligeramente inferiores a los resultados obtenidos en nuestro estudio.

El recuento número de células de los embriones es un dato importante que deberemos tener en cuenta ya que, aun obteniendo tasas de supervivencia elevadas durante el cultivo *in vitro*, las lesiones celulares producidas como consecuencia de la vitrificación pueden afectar a la implantación tras la transferencia a hembras receptoras. Por ello, este valor se considera como un indicador de la calidad embrionaria.

En el estudio anteriormente mencionado, realizado por *Trigal y cols.*(2012b), el resultado del recuento de células totales fue inferior al obtenido en nuestro experimento. Por otro lado, *Trigal y cols.* (2013), realizaron otro estudio en el que se valoraba la supervivencia y calidad de embriones vitrificados tras haber sido sometidos a altas presiones hidrostáticas subletales. En este caso se emplearon como grupo control, embriones producidos *in vitro* vitrificados siguiendo un protocolo similar al nuestro, utilizando como dispositivo de almacenamiento el *Fibreplug*. Este grupo difería de nuestro experimento en el protocolo de calentamiento, en este caso, sometiendo la muestra a una doble incubación en soluciones con concentraciones decrecientes de sucrosa. Los resultados obtenidos en el recuento de células fueron muy similares a nuestros resultados. De esta manera podríamos considerar que la calidad de los embriones calentados en paso único en la propia pajuela, no presenta diferencias significativas con los embriones que han sufrido un protocolo de calentamiento en varios pasos.

## **CONCLUSIÓN**

El calentamiento de embriones en la misma pajuela empleada para la transferencia en una solución de sucrosa 0,25 M a 41°C, durante 5 minutos, permitió obtener resultados de supervivencia, eclosión y número de células totales comparables a los conseguidos en el grupo control.

Este estudio demuestra que es posible la vitrificación y el calentamiento de embriones bovinos producidos *in vitro*, de forma que se pueda realizar su transferencia directa. No obstante son necesarias más réplicas y confirmar la calidad de los embriones con ensayos de transferencia en hembras receptoras.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdalla, H., Shimoda, M., Hara, H., Morita, H., Kuwayama, M., Hirabayashi, M., Hochi, S., 2012, **Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age**, *Theriogenology*, **74**: 1028-35
2. Akiyama, K., Kobayashi, J., Sato, Y., Sata, R., Oshashi, M., Sasaki, E., Od, Y., Ogawa, Y., Veda, S., Nabenishi, H, Matoba, S., 2012, **Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in-straw dilution**, *Animal Science Journal*, **81**: 461-6
3. Bielanski, A., Vajta, G., 2009, **Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units**, *Human Reproduction*, **24**: 2457-67
4. Brügeller, P., Mayer, E., 1980, **Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions**, *Nature*, **288**: 569-71
5. 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**: 1294-1302
6. Cobo, A., Bellver, J., Domingo, J., Pérez, S., Crespo, J., Pellicer, A., Remohí, J., 2008, **New options in assisted reproduction technology**, *Reproductive Biomedicine Online*, **17**: 68-72
7. Criado-Scholz, E., **The Problem of Contamination: Open vs Closed vs Semi-closed vitrification systems**, en: Katkov, I., 2012, **Current frontiers in Cryopreservation**, 1ª ed., Croatia: In-Tech, pp: 105-36
8. Díez, C., Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción, 2012-2013
9. Gómez, E., Muñoz, M., Rodríguez, A., Caamaño, JN., Facal, N., Díez, C., 2009, **Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro inflicts selective damage to the inner cell mass**, *Reproduction in Domestic Animals*, **44**: 194-9

10. Gómez, E., Rodríguez, A., Muñoz, M., Caamaño, JN., Hidalgo, CO., Morán, E., Facal, N., Díez, C., 2008, **Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification**, *Theriogenology*, **69**: 1013-21
11. Holm, P., Booth, PJ., Schmidt, MH., Greve, T., Callesen, H., 1999, **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*, **52**: 683-700
12. Inaba, Y., Aikawa, Y., Hirai, T., Hashiyada, Y., Yamanouchi, T., Misumi, K., Ohtake, M., Somfai, T., Kobayashi, S., Saito, N., Matoba, S., Konishi, K., Imai, K., 2011, **In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop**, *Journal of Reproduction and Development*, **57**: 437-43
13. Kim, YM., Uhm, SJ., Gueta, MK., Yang, JS., Lim, JG., Das, ZC., Heo, YT., Chung, HJ., Kong, IK., Kim, NH., Lee, HT., Ko, DH., 2012, **Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container**, *Theriogenology*, **78**: 1085-93
14. Kuwayama, M., 2007, **Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method**, *Theriogenology*, **67**: 73-80
15. Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., Leibo, SP., 2005, **Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes**, *Reproductive Biomedicine Online*, **11**: 300-8
16. Li, W., Zhou, X., Wang, H., Liu, B., 2012, **Numerical analysis to determine the performance of different oocyte vitrification devices for cryopreservation**, *Cryoletters*, **33**: 144-50
17. Morató, R., Izquierdo, D., Paramio, MT., Mogas, T., 2012, **Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of in vivo-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages**, *Reproduction, Fertility and Development*, **22**: 1141-7
18. Morató, R., Mogas, T., 2012, **One-step cryoprotectant dilution following vitrification of in vitro-produced bovine embryos**, *Reproduction, Fertility and Development*, **25**: 182

19. Mukaida, T., Takahashi, K., Kasai, M., 2003, **Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique**, Reproductive Biomedicine Online, **6**: 221-5
20. National Statistical of embryo transfer activity in Europe. European Society of Embryo Transfer Meeting 2012. Proceedings: pp. 43
21. Nei, T., 1976, **Freezing injury to erythrocytes. I. Freezing pattern and post-thaw hemolysis**, Cryobiology, **13**: 278-86
22. Parrish, JJ., Susko-Parrish, JL., Handrow, RR., Sims, MM., First, NL., 1989, **Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid**, Biology of Reproduction, **40**: 1020-5
23. Rall, WF., Fahy, GM., 1985, **Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification**, Nature, **313**: 573-5
24. Rizos, D., Clemente, M., Bermejo-Alvarez, P., de la Fuente, J., Lonergan, P., Gutierrez-Adán, A., 2008, **Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality**, Reproduction in Domestic Animals, **43**: 44-50
25. Schmidt, PJ., 2006, **Basile J. Luyet and the beginnings of transfusion criobiology**, Transfusion Medicine Reviews, **20**: 242-6
26. Taniguchi, M., Ikeda, A., Arikawa, E., Wongsrikeao, P., Agung, B., Naoi, H., Nagai, T., Otoi, T., 2007, **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, **53**: 963-9
27. Trigal, B., 2012, **Contribuciones al cultivo, selección de sexo y supervivencia a la criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro***, 1ª ed., León: Universidad de León
28. Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, JN., Muñoz, M., Correia, E., Carrocera, S., Martín, D., Díez, C., 2012a, **Survival and cell counts of in vitro produced bovine embryos vitrified in fibreplugs and warmed by one-step procedure**, Reproduction in Domestic Animals, **47**: 94

29. Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, JN., Muñoz, M., Correia, E., Martín, D., Carrocera, S., Díez, C., 2012b, **Improved survival to one-step re-hydration of vitrified-warmed VS frozen-thawed IVP Bovine Blastocysts**, *Reproduction Fertility and Development*, **25**: 189
30. Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, JN., Muñoz, M., Moreno, J., Carrocera, S., Martín, D., Díez, C., 2012c, **In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm**, *Theriogenology*, **78**: 1465-75
31. Trigal, B., Muñoz, M., Gómez, E., Caamaño, JN., Martín, D., Carrocera, S., Casais, R., Díez, C., 2013, **Cell counts and survival to vitrification of Bovine in vitro produced blastocysts subjected to Sublethal High Hydrostatic Pressure**, *Reproduction in Domestic Animals*, **48**: 200-6
32. Ali, J., Shelton, J., **Development of vitrification solutions**, en: Tucker, MJ., Liebermann, J., 2007, **Vitrification in Assisted Reproduction: A user's Manual and Trouble-shooting Guide**, 1ª ed., London: Informa Healthcare, pp: 45-64
33. Vajta, G., 2000, **Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals**, *Animal Reproduction Science*, **60-61**: 357-64
34. Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, PJ., 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**: 53-8
35. Vajta, G., Kuwayama, M., 2006, **Improving cryopreservation systems**, *Theriogenology*, **65**: 236-44
36. Vajta, G., Murphy, CN., Macháty, Z., Prather, RS., Greve, T., Callesen, H., 1999, **In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the Open Pulled Straw method**, *Veterinary Record*, **144**: 180-1
37. Vajta, G., Nagy, ZP., 2006, **Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification**, *Reproductive Biomedicine Online*, **12**: 779-96

38. Vajta, G., Reichart, A., Filippo, V., Rienzi, L., 2013, **From a backup technology to a strategy-outlining approach: the success story of cryopreservation**, Expert Review of Obstetrics and Gynecology, **8**: 181-190
39. Vanderzwalmen, P., Zech, NH., Ectors, F., Stecher, A., Lejeune, B., Vanderzwalmen, S., Wirleitner, B., 2012, **Blastocyst transfer after aseptic vitrification of zygotes: an approach to overcome an impaired uterine environment**, Reproductive Biomedicine Online, **25**: 591-9
40. Vieira, AD., Forell, F., Feltrin, C., Rodrigues, JL., 2006, **In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes**, Animal Reproduction Science, **99**: 377-83
41. Yang, ZQ., Zhou, GB., Hou, YP., Yan, CL., Zhu, SE., 2007, **Effect of in-straw thawing on in vitro- and in vivo-development of vitrified mouse morulae**, Animal Biotechnology, **18**: 13-22