

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
Evaluación de dos protocolos de criopreservación de embriones bovinos
producidos *in vitro* sobre la tasa de sobrevivencia *in vitro*

Estudiante

Mario Antonio Posas Hernandez

Asesores

John Jairo Hincapié, D.Sc.

Rogel Castillo, MSc.

Honduras, agosto 2023

Autoridades

SERGIO ANDRES RODRIGUEZ ROYO

Rector

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora de Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario general

Contenido

Resumen	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Materiales y Métodos.....	11
Obtención de los CCO Bovinos.....	11
Maduración <i>in vitro</i> (MIV).....	11
Fertilización <i>in vitro</i> (FIV)	12
Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	13
Vitrificación de Embriones.....	15
Protocolo de Vitrificación Minitube (2012, Alemania) Utilizando la Técnica Open Pulled Straw (OPS)	15
Paso 1.....	17
Paso 2.....	17
Paso 3.....	17
Paso 4.....	17
Paso 5.....	17
Paso 6.....	17
Paso 7.....	18
Paso 8.....	18
Devitrificación (Calentamiento) Protocolo Minitube	19
Paso 1.....	19
Paso 2.....	20
Paso 3.....	20
Paso 4.....	20
Paso 5.....	21

Protocolo de Congelación lenta (Curtis 2009)	21
Congelación.....	21
Tratamientos.....	22
VARIABLES ANALIZADAS	22
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	23
Resultados y Discusión.....	24
Valores Medios del Diámetro Externo (μm) de los Blastocistos en Fresco y al Descongelar/Calentar en el Medio de Cultivo <i>in vitro</i>	26
Valores Medios del Diámetro (μm) del Macizo Celular Interno (MCI) en Fresco y al Descongelar/Calentar a las 0, 6, 12, 24 y 48 Horas del Cultivo <i>in vitro</i>	29
Porcentajes (%) del Total del Macizo Celular Interno (MCI) al Descongelar/Calentar a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas de Cultivo <i>in vitro</i> con Base en el Diámetro del MCI en Fresco	31
Conclusiones	39
Recomendaciones.....	40
Referencias.....	41
Anexos.....	47

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Clasificación de los Complejos <i>Cumulus</i> Oocitos (CCO) para procesos de producción <i>in vitro</i> (PIV).....	12
Cuadro 2 Morfología de los embriones bovinos de acuerdo con el estado embrionario	14
Cuadro 3 Clasificación de los embriones de acuerdo con la calidad	14
Cuadro 4 Valores medios del diámetro externo (μm) de los blastocistos bovinos en fresco y al descongelar/calentar en el medio SOF de cultivo <i>in vitro</i>	28
Cuadro 5 Valores medios del diámetro (μm) del Macizo Celular Interno (MCI) de blastocistos bovinos en fresco y al descongelar/calentar en medio SOF de cultivo <i>in vitro</i>	30
Cuadro 6 Valores medios de los porcentajes (%) del total del Macizo Celular Interno (MCI) al descongelar/calentar a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas de cultivo <i>in vitro</i> en medio SOF, con base en el diámetro del MCI en fresco	31
Cuadro 7 Valores medios de los porcentajes de eclosión (sobrevivencia) de blastocistos congelados-descongelados y vitrificados-calentados a las 24, 48 y 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> en medio SOF	33
Cuadro 8 Valores medios de los porcentajes de blastocistos congelados-descongelados y vitrificados-calentados con zona pelúcida íntegra (ZP) y degenerados a las 24, 48 y 72 horas de cultivo <i>in vitro</i> en medio SOF.....	35
Cuadro 9 Clasificación de los blastocistos de acuerdo con el grado de expansión y a las horas de cultivo <i>in vitro</i> en medio SOF.....	38

Índice de Figuras

Figura 1 Clasificación de embriones bovinos; Estadios de desarrollo de embriones (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, 2011).....	15
Figura 2 Placa nunc de cinco pozos y su correspondiente numeración	16
Figura 3 Colocación de la pajuela OPS para aspirar los embriones durante la vitrificación	18
Figura 4 Izquierda: ángulo de colocación de la pajuela OPS. Derecha: colocación del dedo en la parte gruesa de la pajuela OPS para expulsar los embriones.	20
Figura 5 Grupo de oocitos categoría I al momento de colocarlos a maduración <i>in vitro</i>	24
Figura 6 Izquierda: Diámetro de blastocito pre-congelación lenta. Derecha: diámetro blastocisto pos-descongelación hora 0.	27
Figura 7 Izquierda: Diámetro de blastocito pre-vitrificación. Derecha: diámetro blastocisto al calentamiento hora 0.....	27

Índice de Anexos

Anexo A Lavado y acondicionamiento de ovarios recolectados.....	47
Anexo B Aspiración folicular	48
Anexo C Maduración <i>in vitro</i> (MIV):deposición de fluido folicular en baño maría.	49
Anexo D Lavado en medio FIV.	50
Anexo E Equipo para la congelación lenta CRYOLOGIC® modelo CL 2200 Standard System	51
Anexo F Proceso de vitrificación.....	52

Resumen

El objetivo general fue evaluar dos métodos de criopreservación de embriones bovinos: la vitrificación (V) y la congelación lenta (CL) y como objetivos específicos determinar el diámetro (μm) de los embriones al momento de la vitrificación-calentamiento (V-C) y congelación-descongelación (CL-D), diámetro (μm) y el porcentaje de reexpansión a las 12, 24 y 48 horas calentamiento (C) y descongelación (D), porcentaje de embriones con zona pelúcida íntegra (sin fracturas), porcentaje de embriones degenerados. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (V y CL) y 30 repeticiones (embriones) por tratamiento. Se utilizó un ANDEVA y la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). No hubo diferencias ($P > 0.05$) en los valores medios del diámetro externo de los blastocistos en fresco antes de la CL y V (rango 143-150 μm) ni el diámetro de los blastocistos durante el proceso de (D) o (C) (rango 137-141 μm). El diámetro del Macizo Celular Interno (MCI) al momento del (D) o (C) fue similar entre tratamientos ($P > 0.05$) (rango 91-99 μm), sin embargo, los embriones (CL-D) presentaron el mayor diámetro entre las 6 y 12 horas de iniciado el proceso; el diámetro del MCI a las 48 horas fue similar ($P > 0.05$; rango 105-112 μm). El mayor porcentaje de eclosión (sobrevivencia) ($P \leq 0.05$) fue con la V-C a las 72 horas (52.17%) de CIV. El mayor porcentaje ($P \leq 0.05$) de embriones con ZP íntegra (95.65%) fue con embriones V-C. El porcentaje de expansión fue similar ($P > 0.05$) logrando a las 48 horas valores entre 50-60%. El mejor protocolo de criopreservación para embriones producidos *in vitro* es la vitrificación.

Palabras clave: Blastocistos, blastocistos expandidos, congelación lenta, vitrificación, zona pelúcida

Abstract

The general objective was to evaluate two methods of bovine embryo cryopreservation: Vitrification (V) and slow freezing (SF) and as specific objectives to determine the diameter (μm) of embryos at the time of vitrification-warming (V-W) and freeze-thawing (F-T), diameter (μm) and the percentage of re-expansion at 12, 24, and 48 hours warming (W) and thawing (T), percentage of embryos with intact zona pellucida (without fractures), percentage of degenerated embryos. A Completely Randomized Design (CRD) was used with two treatments (V and SF) and 30 replicates (embryos) per treatment. An ANDEVA and Chi-square test (χ^2) were used. There were no differences ($P > 0.05$) in the mean values of fresh blastocyst outer diameter before SF and V (range 143-150 μm) nor blastocyst diameter during (T) or (W) processing (range 137-141 μm). The diameter of the inner cell mass (ICM) at the time of (T) or (W) was similar between treatments ($P > 0.05$) (range 91-99 μm), however, embryos (SF-T) presented the largest diameter between six and 12 hours after initiation of the process; the diameter of the ICM at 48 hours was similar ($P > 0.05$; range 105-112 μm). The highest percentage of hatching (survival) ($P \leq 0.05$) was with V-W at 72 hours (52.17%) of IVC. The highest percentage ($P \leq 0.05$) of embryos with intact ZP (95.65%) was with V-W embryos. The percentage of expansion was similar ($P > 0.05$) achieving at the 48 hours values between 50-60%. The best cryopreservation protocol for embryos produced *in vitro* is vitrification.

Keywords: Blastocysts, expanded blastocysts, slow freezing, vitrification, zona pellucida.

Introducción

La biotecnología es una de las ramas dentro de la ciencia de la reproducción animal, que juega uno de los roles más importantes, en cuanto al éxito de producir mejoras dentro de los hatos ganaderos a nivel mundial. El desarrollo de técnicas y de tecnologías que favorezcan y permitan el éxito, a la reproducción animal asistida es una necesidad con alta relevancia, con el desarrollo y avance de las biotecnologías como la fertilización *in vitro*, trasplante de embriones, super ovulación de hembras de clase élite, y aspiración de ovocitos, brindan excelentes resultados en cuanto a preñez y producción de animales con características con base en fenotipos y genotipos superiores, que sean altamente productivos y eficientes en la producción cárnica o láctea y que sean resistentes a las diversas condiciones ambientales Hernández-Pichardo et al. (2018).

Los métodos de preservación se hacen un punto decisivo a tomar en cuenta, para garantizar la viabilidad del material genético animal (FAO 2019). La conservación de los recursos zoo-genéticos hace referencia a las medidas adoptadas para evitar la pérdida de diversidad genética en las poblaciones de ganado, incluyendo la protección de las razas frente a la extinción. Puede incluir tanto la conservación de las poblaciones vivas como la crioconservación (conservación mediante congelación a temperaturas extremadamente bajas) de material tal como semen o embriones.

Según Fernández et al. (2021) la primera criopreservación exitosa de embriones fue reportada en murinos en 1972. Un año después, se logró el nacimiento del primer becerro procedente de un blastocisto previamente criopreservado usando una solución 2M de dimetilsulfóxido (DMS) y empleando una tasa de congelación y descongelación de 0.2 °C/min y 36 °C/min, respectivamente. Durante un periodo de más de 10 años el glicerol fue el criopreservante más utilizado para la preservación de embriones bovinos; sin embargo, en 1992 se implementó un nuevo método de preservación para transferencia directa de embriones con el uso de etilenglicol como criopreservante; esto tuvo un efecto rápido y positivo a nivel mundial en la industria de la transferencia de embriones hasta nuestros días (Hasler 2014). Según datos de la Asociación Americana de Transferencia de Embriones, en 2009 se tenía contabilizado que aproximadamente 99% de los embriones bovinos de

razas cárnicas y 94% de embriones bovinos de razas lecheras fueron congelados en etilenglicol para transferencia directa.

En la actualidad uno de los principios más importantes de la criopreservación de embriones es lograr su almacenamiento en condiciones de bajas temperaturas (-196 °C), intentando mantener su integridad a través de la remoción del máximo volumen posible de agua antes de su congelamiento, con lo cual se evita la formación de hielo (Seidel 1996).

Dentro de los métodos más utilizados para la preservación de embriones destacan dos técnicas: la vitrificación, y la congelación lenta, ambas son muy utilizadas dentro de la biotecnología animal por su versatilidad; en el caso del proceso de vitrificación presenta la ventaja que evita la formación de cristales de hielo, estos se forman de manera intra y extracelular, que ocasionan daño a los embriones y generan cambios osmóticos; los daños que se pueden generar durante el proceso de congelación lenta (método más utilizado), por otro lado en el proceso de vitrificación también se reportan daños, los cuales afectan a la zona pelúcida según experimentos realizados por (Vajta et al. 1998) el 4.8% de los embriones descongelados en sus experimentos presentaron fracturas en la zona pelúcida, en general los valores reportados en procesos de vitrificación con el método Open-Pulled-Straw (OPS) son bajos con autores que describen o reportan bajas incidencias de fracturas en la zona pelúcida de hasta el 1% (Vajta et al. 1997).

Las fracturas a la zona pelúcida son fenómenos muy comunes que ocurren cuando los embriones son congelados o descongelados rápidamente usando pajuelas tradicionales, alcanzando valores de fracturas de 20% a 27%. En cuanto a la tasa de preñez resultados obtenidos de la transferencia directa de más de 19000 embriones bovinos en Canadá, demostraron una tasa de preñez del 58% (Mapletoft 1998). El éxito en la congelación de embriones bovinos depende de varios factores; sin embargo, lo que persiguen los principios fundamentales de la congelación es la protección celular frente a los principales efectos perjudiciales del proceso, tales como formación de hielo intracelular, deshidratación y efecto tóxicos de los crioprotectores; al mismo tiempo otra de las ventajas del proceso de vitrificación es la reducción del tiempo y de la metodología, logrando ser un método

simple, rápido y efectivo ya que tiene un rango de duración de dos a 30 minutos, reduciendo los costos de producción y siendo un proceso más rentable que el proceso de congelación lenta, ya que como esta no requiere de equipos especializados de congelación, ni de un medio específico de criopreservación, otra de las ventajas que presenta el método de vitrificación es la facilidad del transporte y puede efectuarse en cualquier laboratorio. Este método de criopreservación es aplicado a programas reproductivos y a programas de conservación de especies en peligro de extinción.

Con base en lo anterior, se desarrolló esta investigación, la cual tuvo como objetivos específicos determinar el diámetro (μm) de los embriones al momento de la congelación y/o vitrificación, determinar el diámetro (μm) de los embriones al momento de la descongelación y/o desvitrificación, determinar el diámetro (μm) y el porcentaje de reexpansión a las 6, 18, 24 y 48 horas; determinar el porcentaje de embriones con zona pelúcida íntegra (sin fracturas) y determinar el porcentaje de eclosión a las 72 horas pos-cultivo: en fresco, pos-descongelación y pos-desvitrificación (calentamiento).

Materiales y Métodos

La investigación se realizó entre febrero-junio del 2023 en el laboratorio de biotecnología de la reproducción animal de Zamorano, localizado en el Valle del Río Yeguare a 32 km de Tegucigalpa, Honduras, con una precipitación promedio anual, altura sobre el nivel del mar y temperatura promedio anual de 1100 mm, 800 msnm y 26 °C, respectivamente.

Los oocitos (Complejos *Cumulus* Oocitos CCO), fueron obtenidos de ovarios de vacas faenadas en la planta de proceso de la Empresa Agropecuaria S.A. (EMPASA), localizada a 5 km del laboratorio de biotecnología.

Obtención de los CCO Bovinos

Al momento de ser faenadas las vacas, los ovarios fueron recolectados y depositados en el termo con solución de transporte (solución salina [0.9% NaCl] a 35 °C + estreptomicina [SIGMA S6501] 0.5 g/L + penicilina G [SIGMA P7794] 100,000 UI/L), conservando un tiempo de transporte no mayor a cuatro horas desde la recolecta. Inmediatamente en el laboratorio se realizó el acondicionamiento (retirar los restos de tejidos periováricos, grasa y sangre), y se inició el proceso de aspiración folicular (jeringas de dos piezas y agujas estériles calibre 18 × 1 ½ pulgadas); se realizó la aspiración de los folículos con un rango de diámetro entre 3 y 10 mm, depositando el líquido folicular en un tubo de policarbonato estéril de 50 mL el cual contenía 5 mL de Medio de Colección de Oocitos (MCO) de Minitube 19990/0050® utilizando 10 mL + 60 mg de Suero Albúmina Bovino EFAF (SIGMA A8806) teniendo la precaución de atemperar todo a 38 °C por lo menos cuatro horas antes de realizar la maniobra.

Maduración *in vitro* (MIV)

Una vez colectado el fluido folicular en el tubo, éste fue colocado en el baño maría durante 15 minutos con el objetivo de favorecer la precipitación de los oocitos; posteriormente se eliminó el sobrenadante dejando entre 5 a 7 mL de fluido el cual fue vertido en una placa grid para iniciar la búsqueda, selección y clasificación de los oocitos (CCO) en el estereoscopio (60X). Se utilizaron los criterios establecidos por Wit et al. (2000), solo se utilizaron los CCO con clasificación 1 y 2 (Cuadro 1);

los CCO seleccionados se lavaron cuatro veces en MCO, y luego depositados en placas nunc de cuatro pozos, con 500 μ L de Medio de Maduración de Oocitos (MMO) cubierto con aceite mineral (SIGMA M8410) /pozo, conservando la proporción de 1 ovocito/10 μ L de medio, y luego llevados a la incubadora a 38.5 °C, 5% de CO₂, 20% de O₂, saturación de HR, durante 24 horas. Para la preparación del medio de maduración (MMO) se mezclaron 9 mL del MMO de Minitube MMO 19990/0010® + 100 μ L de FSH stock (Sioux Biochemical Inc. 715) + 50 μ L de LH stock (Sioux Biochemical Inc. 725) + 1 mL de suero de vaca en celo (preparación propia).

Cuadro 1

Clasificación de los Complejos Cumulus Oocitos (CCO) para procesos de producción in vitro (PIV).

Clasificación	Categoría	Células del <i>Cumulus</i>	Citoplasma
1	Excelente	Capas múltiples y compactas de células (cuatro o más)	Homogéneo y transparente
2	Bueno	Capas múltiples de células (entre una y tres)	Homogéneo con zonas periféricas oscuras
3	Regular	Sin células (Denudados)	Irregular con zonas oscuras
4	Malo	Células expandidas	Irregular con zonas oscuras

Nota. Tomado de Wit et al. (2000)

Fertilización *in vitro* (FIV)

Para esa etapa se utilizaron dos medios: uno de acondicionamiento y capacitación y otro para la fertilización propiamente dicha. Como medio de capacitación se utilizó el medio Minitube 19990/0020®, colocando 10 mL + 1000 μ L piruvato de sodio (SIGMA P3662) (solución stock) + 120 mg Suero Albúmina Bovino fracción V (SIGMA A8806) + 200 μ L gentamicina (SIGMA G1397). Una vez preparada esta solución se tomaron 8 mL en un tubo y se rotularon como “solución de lavado de espermias” y en otro tubo se colocaron 2 mL que se utilizaron para preparar el gradiente de Percoll 45-90%; ambos tubos fueron llevados a la incubadora a 38.5 °C, 20% de O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (> 90%) dos horas antes de la maniobra.

Para la fertilización propiamente dicha se tomaron 10 mL del medio Minitube 19990/0030® + 60 mg Suero Albúmina Bovino EFAF (SIGMA A8806) + 100 μ L piruvato de sodio (SIGMA P3662) + 200 μ L heparina (SIGMA H3393), y se depositaron 600 μ L de este medio en cada pozo de las placas nunc

(no cubrir con aceite) para posteriormente ser llevados a la incubadora a 38.5 °C, 20% de O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (> 90%) dos horas antes de la maniobra.

Se utilizó la técnica de Percoll para el acondicionamiento del semen. Para preparar el gradiente de Percoll 45-90% se utilizó un tubo de policarbonato de 15 mL en el cual se depositó el Percoll 45% y luego por sotoposición se depositó en el fondo el gradiente 90% (SIGMA P4937).

Transcurridas 24 horas de MIV, los CCO fueron retirados de la incubadora, lavados tres veces en medio FIV y transferidos a las placas nunc de fertilización (40 CCO/pozo). Para fertilizar los CCO se utilizó semen congelado/descongelado de un toro Brahman probado para PIV. Se utilizó una concentración aproximada de 6000 espermatozoides/CCO (240,000 espermatozoides/250 µL/pozo equivalentes a 1×10^6 espermatozoides/mL), luego llevados a la incubadora por 18 horas a 38.5 °C, 20% de O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (> 90%).

Cultivo *in vitro* (CIV)

Terminado el tiempo de FIV (18 horas) los presuntos cigotos fueron sometidos al proceso de denudación (eliminar las células del *Cumulus oophorus*), luego fueron lavados tres veces en SOF y transferidos a las placas nunc de cultivo (cada pozo con 400 µL de SOF suplementado y cubiertos con aceite mineral [SIGMA M8410]) las cuales fueron atemperadas (38.5 °C, 5% de O₂, 5% CO₂, 90% N₂ y humedad relativa a saturación [> 90%]) dos horas antes de la maniobra. Se utilizó el medio de cultivo SOF Minitube 19990/0041[®] (10 mL) + 1 mL suero de vaca en celo + 400 µL aminoácidos esenciales (SIGMA B6676) + 100 µL aminoácidos no esenciales (SIGMA M7145) + 60 µL gentamicina (SIGMA G1397); 72 horas posteriores al inicio del cultivo, se suplementó con 10% de Suero Fetal Bovino (SIGMA F3018); cumplidos siete días de cultivo, los blastocistos obtenidos fueron clasificados con base en los criterios de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS 2009) (Cuadro 2 y 3) y distribuidos/sometidos al proceso de congelación lenta y/o vitrificación de acuerdo con los grupos de tratamientos.

Cuadro 2

Morfología de los embriones bovinos de acuerdo con el estado embrionario

Estado embrionario	Morfología
Blastocisto temprano (Bt)	Día 6-7, 100-200 blastómeros. Inicio del transporte de fluido en las células trofoectodérmicas (inicia formación del blastocele). El MCI ocupa alrededor del 70-80% del espacio perivitelino. Se puede diferenciar el trofoblasto del MCI
Blastocisto (B)	Día 7-8, 100-200 células aproximadamente. Marcada diferenciación entre las células del trofoblasto, que constituyen una pared –que se adosa a la zona pelúcida- y el MCI (o disco embrionario de color oscuro).
Blastocisto Expandido (Be)	Días 7-8, más de 200 células. El diámetro aumenta considerablemente (1.2 a 1.5 veces) con el consecuente adelgazamiento de la ZP a 1/3 de su espesor original. La presión creciente del blastocisto provoca la ruptura de la ZP a través de la cual comenzará la protrusión hacia el día 8
Blastocisto protruido (Bp)	Días 8-9, 200-800 células. Los embriones abandonan la ZP. Forma esférica con blastocele definido.

Nota. Tomado de. IETS (2009)

Cuadro 3

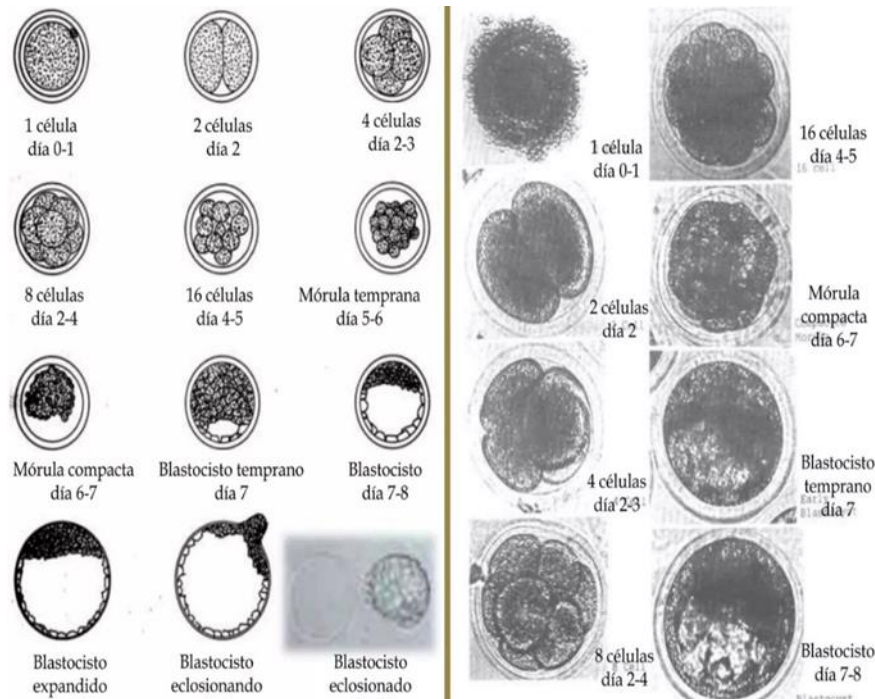
Clasificación de los embriones de acuerdo con la calidad

Calidad	Descripción
Excelentes (Clase 1)	Un embrión ideal, esférico, simétrico y con células de tamaño, color y textura uniforme. Zona pelúcida intacta. Debe coincidir con su edad
Buenos (Clase 2)	Presentan pequeñas imperfecciones, como unas pocas blastómeras de forma irregular y posee una pequeña cantidad de detritus celulares. Zona pelúcida intacta
Regulares (Clase 3)	Problemas más definidos que incluyen blastómeras desprendidas e irregulares, vesículas y algunas células degeneradas, detritus celulares. Zona pelúcida intacta o ligero agrietamiento. Un 60% de los blastómeros es normal. Desarrollo retrasado. Color muy oscuro o claro.
Malos (Clase 4)	Embriones que presentan problemas severos, como numerosas blastómeras desprendidas, células degeneradas y/o fragmentadas, células de variables tamaños, numerosas vesículas, pero una aparente masa de embrión viable. Retraso de más de dos días en el desarrollo. Menos del 30% de blastómeros intactos. Ruptura de la ZP. Estos embriones generalmente no son de calidad para transferirlos.
Degenerados (Clase 5)	Degeneración grave. Serios problemas de apoptosis. Zona pelúcida intacta. Cúmulo celular suelto y degenerado, blastómeros pignóticos

Nota. Tomado de IETS (2009)

Figura 1

Clasificación de embriones bovinos; Estadios de desarrollo de embriones (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones 2011).



Vitrificación de Embriones

Aproximadamente el 50% de los embriones obtenidos en estadio de blastocisto (B) y blastocisto expandido (Be) fueron vitrificados de acuerdo con el protocolo establecido por Minitube (Alemania).

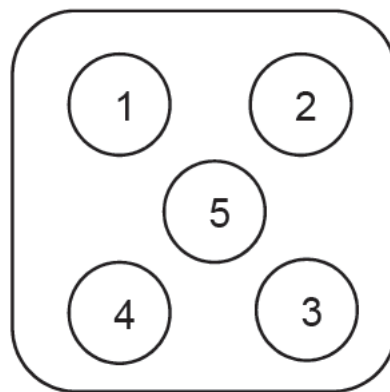
Protocolo de Vitrificación Minitube (2012, Alemania) Utilizando la Técnica Open Pulled Straw (OPS)

Preparación de la solución de mantenimiento (Holding medium: HM): TCM-199 10X (SIGMA 5017), diluir en 100 mL de agua ultrapura, esterilizar por filtración a 0.22 μm y guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en alícuotas de 5 mL. El día de la vitrificación preparar 20 mL de HM + 100 mg de BSA FAF (SIGMA A8806) esterilizar por filtración a 0.22 μm , de esta solución HM colocar 10 mL en un tubo de policarbonato estéril y adicionar 2.56 g de sucrosa (SIGMA S1888), disolver (puede requerir vortex y ligero calentamiento), esterilizar por filtración a 0.22 μm y almacenar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, de esta forma se ha preparado la solución de vitrificación 0.71 Mol.

Para preparar la solución de devitrificación (calentamiento) 1 Mol: tomar 10 mL de la solución HM + 1.026 g de sucrosa (SIGMA S1888), disolver (puede requerir vortexing y ligero calentamiento), esterilizar por filtración a 0.22 μm y almacenar a 4 °C. Cada paso de los que se describe a continuación se efectuó a temperatura del laboratorio (25-27 °C). Todas las soluciones estaban atemperadas a 38 °C (baño maría). Se utilizaron placas nunc de cinco pozos (Figura 2).

Figura 2

Placa nunc de cinco pozos y su correspondiente numeración



Agregue a los pocillos de una placa de cinco pocillos para cultivo de embriones las siguientes soluciones:

Pocillo 1: HM 800 μL

Pocillo 2: HM 800 μL

Pocillo 3: HM 850 μL + EG 75 μL (Bioniche, Animal Health, Inc. USA) + DMSO 75 μL (SIGMA D8418)

Pocillo 4: solución de vitrificación (medio de sucrosa) (0.71 M) 670 μL + EG 165 μL + DMSO 165 μL

La solución de vitrificación en pocillo cuatro se equipará a 0.5 M de sucrosa disuelta.

Coloque la placa sobre platinas atemperadas (temperatura +39 hasta +41 °C). Cubra y mantenga temperados todos los pocillos.

Coloque a enfriar en N_2 los contenedores OPS y los casetes de almacenamiento.

Paso 1

Coloque los embriones (hasta 30) en el pocillo uno, transfiriendo lo menos posible el aceite que ha cubierto los pocillos de cultivo.

Paso 2

Después de aproximadamente un minuto, transfiera todos los embriones al pocillo dos. Este pocillo es utilizado para guardar los embriones durante la vitrificación por pasos. Evite la transferencia de aceite.

Paso 3

Transfiera una gota de 20 μ L desde el pocillo cuatro al borde derecho del pocillo cinco.

Paso 4

Transfiera uno a seis embriones al pocillo tres con el menor volumen posible de medio (el número aproximado puede cambiar, de acuerdo con el método y la experiencia del operador. En los experimentos iniciales se aconseja uno o máximo dos en un grupo). Cargue primero la pipeta con el nuevo medio y entonces expulse suavemente los embriones. Trate de mantenerlos juntos y en el fondo del pocillo. Si fuera necesario, llene nuevamente los boxes con N_2L para compensar la evaporación. Tiempo de equilibrio: tres minutos.

Paso 5

Levante el extremo abierto del contenedor OPS mediante la pinza de tamaño medio e insértelo en el vaso con N_2L . Dirija el extremo abierto del contenedor hacia arriba.

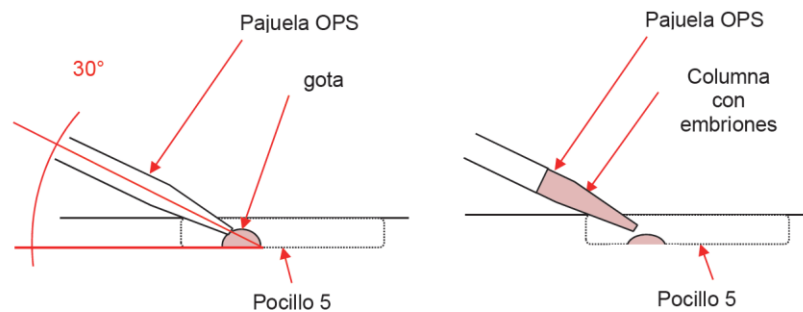
Paso 6

Sujete la pajueta OPS con su mano izquierda, pero no tape el extremo más grueso con su dedo. Transfiera los embriones con el menor volumen posible al interior de la gota de 20 μ L. Llene primero la punta de la pipeta con el nuevo medio, luego expulse embriones. aspire nuevamente y expulse. Tiempo de equilibrio: 40 a 45 segundos. aspire los embriones en aproximadamente 1 μ L y forme una gota pequeña y alta a la izquierda, cercana al centro del pocillo cinco de la placa de cultivo de embriones de cinco pocillos. Inmediatamente después, toque el lado izquierdo de la gota con el

extremo delgado de la pajuela OPS, mantenida en un ángulo aproximado de 30° con relación al fondo horizontal. Debiera formar una columna de solución de vitrificación de aproximadamente 1 mm de altura que contenga los embriones (Figura 3).

Figura 3

Colocación de la pajuela OPS para aspirar los embriones durante la vitrificación



Paso 7

Sumerja la pajuela OPS dentro del N₂L con un movimiento rápido y continuo, pasando muy rápidamente por la fase de vapor. La pajuela debiera mantenerse inicialmente casi horizontal debiendo luego cambiarse a la posición vertical. Si Usted toca la superficie en posición vertical, el vapor de N₂L resultante del toque con la solución de vitrificación atemperada, puede explosionar la solución de vitrificación con los embriones. Pase rápidamente a través de la fase de vapor del N₂L y continúe con un movimiento rápido al interior del N₂L.

Paso 8

Saque la pajuela OPS del N₂L e insértela rápidamente en el contenedor OPS. El extremo delgado de la pajuela OPS no debe quedar por más de dos segundos sobre el nivel de N₂L. Empuje la pajuela OPS hacia abajo con una pinza pequeña, a 1 cm bajo el extremo del contenedor OPS. Levante parcialmente el contenedor OPS y selle el extremo abierto. Coloque el contenedor OPS dentro del casete. Repita la vitrificación con otro embrión/ovocito. Antes de cada nuevo ciclo de vitrificación, cambie el medio de la gota de 20 µL. Utilice una gota pequeña nueva para cada ciclo. Transfiera los casetes conteniendo los contenedores OPS a termos de almacenamiento.

Devitrificación (Calentamiento) Protocolo Minitube

Preparación de las placas de cultivo de cinco pozos: Cada uno de los pasos debe efectuarse a temperatura de laboratorio (+25 °C hasta 27 °C). Prepare las soluciones y las placas de cultivo (para dilución fuera de pajueta), o pajuelas de 0.25 mL (para dilución dentro de pajueta) para la descongelación. Todas las soluciones deben calentarse hasta +39 °C (en incubadora o baño maría).

Agregue a los pozos de una placa de cinco pozos para cultivo de embriones las siguientes soluciones:

Pocillo 1: HM 800 µL + solución de devitrificación (solución sucrosa) (1 M) 400 µL

Pocillo 2: HM 800 µL + solución de devitrificación (solución sucrosa) (1 M) 400 µL

Pocillo 3: HM 800 µL + solución de devitrificación (solución sucrosa) (1 M) 200 µL

Pocillo 4: HM 800 µL

La solución atemperada en pocillo uno y dos se equipará a 0.33 M de sucrosa disuelta. La solución atemperada en pocillo tres se equipará a 0.2 M de sucrosa disuelta.

Coloque las placas de cultivo sobre platinas atemperadas (+39 hasta +41 °C). Cúbralas y manténgalas atemperadas.

Enfoque con el microscopio el pozo uno de la placa de cultivo de embriones de cinco pozos. Saque las casetes del termo de almacenamiento y colóquelas en vaso con N₂L. Saque el contenedor OPS del casete. Corte el contenedor sobre el nivel del extremo grueso de la pajueta OPS. Saque la pajueta OPS con la pinza pequeña y proceda a su calentamiento y dilución.

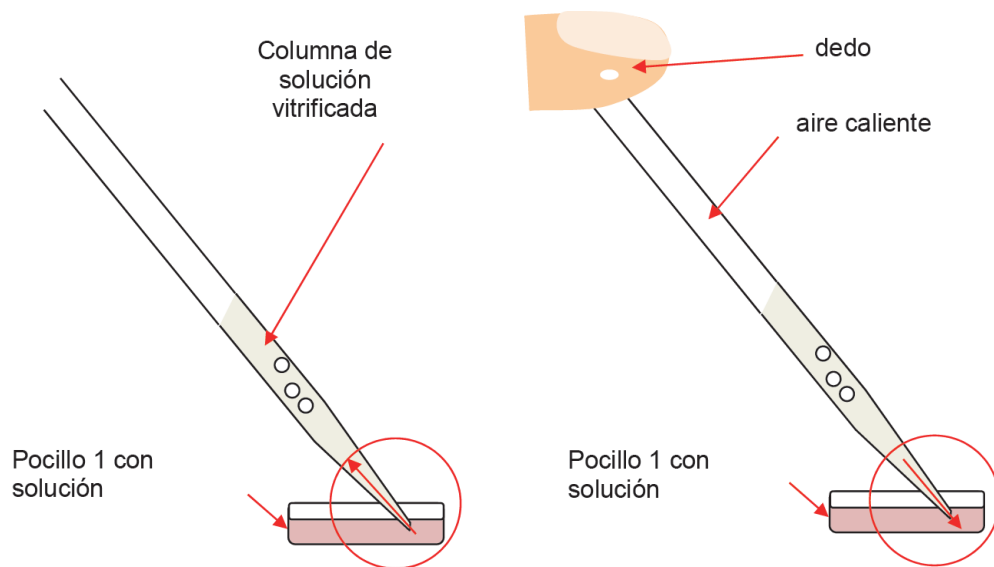
Paso 1

En alrededor de tres segundos sumerja la pajueta OPS en pocillo uno en un ángulo de 30° a 45° (en relación con la horizontal). Sumerja totalmente la columna de líquido vitrificado. Si lo hace demasiado pronto, pueden aparecer burbujas y ocurrir daños de zona. Si lo hace demasiado tarde, se formará hielo antes de sumergir. Puede ocurrir formación transitoria de cristal de hielo, pero esto no dañará a los embriones. Inmediatamente después de derretir la columna, el medio del pozo comienza a ingresar a la pajueta (Figura 3). Justo en este momento, tape el extremo abierto de la pajueta con el

dedo índice. Toda la solución saldrá de la pajuela como resultado del aumento de la presión por el calentamiento del aire dentro de la pajuela (este fenómeno es especialmente impresionante, si las pajuelas han estado enteramente congeladas a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). En muy raras ocasiones, cuando la solución permanece dentro de la pajuela, se debe provocar su salida ajustando una pipeta a su extremo abierto.

Figura 4

Izquierda: ángulo de colocación de la pajuela OPS. Derecha: colocación del dedo en la parte gruesa de la pajuela OPS para expulsar los embriones.



Paso 2

Transfiera los embriones inmediatamente después con $10\text{ }\mu\text{L}$ de solución atemperada del pozo uno al pozo dos, a fin de evitar shock osmótico.

Paso 3

Después de cinco minutos, transfiera los embriones con $10\text{ }\mu\text{L}$ de la solución temperada del pozo dos al pozo tres.

Paso 4

Después de cinco minutos transfiera los embriones al pozo cuatro.

Paso 5

Coloque todos los embriones dentro de una placa de cultivo apropiada y se continuará con el cultivo en el medio SOF Minitube suplementado utilizando placas nunc de cuatro pozos con 600 µL de medio en cada uno y cubiertos con aceite mineral.

Protocolo de Congelación lenta (Curtis 2009).

Congelación

En la primera fase, colocar los embriones en una placa Petri de 30 mm con solución H-SOF. En otra placa Petri de 30 mm colocar etilenglicol (EG) filtrado a 0.22 µm. Esta placa servirá para el lavado de la pajuela, para extraer las columnas iniciales de EG a la pajuela, y para exponer el embrión al EG.

Utilizando una pipeta de FIV aspirar del medio H-SOF el primer embrión a ser congelado y depositarlo en la placa con EG. Se debe procurar depositar la mínima cantidad de H-SOF en el EG. A continuación, se remueve el medio alrededor del embrión para mezclar el H-SOF con el EG. Activar el cronómetro en cuenta regresiva de siete minutos. Cuando hayan transcurrido tres minutos, iniciar con la carga del embrión en la pajuela de 0.25 CC.

Antes de cargar el embrión, lavar la pajuela con medio H-SOF. Cargar una columna de 10 mm de H-SOF, deje una columna de aire de alrededor 6 mm, luego cargue otra columna de 30 mm de H-SOF, posteriormente deje otra columna de 6 mm de aire, luego cargue el embrión en una columna de EG aproximada de 40 mm, luego deje otra columna de aire de 6 mm, luego aspire otra columna 5 mm de H-SOF y deje otra columna de aire donde irá el tapón.

Trasladar la pajuela a la criocámara y colocarla verticalmente. El equipo de congelación CRYOLOGIC® modelo CL 2200 Standard System, debe estar a -6 °C. Al marcar los siete minutos el cronómetro, realizar el realizar el seeding (con una pinza anatómica enfriada en nitrógeno líquido, tocar el menisco de la columna que contiene el embrión durante 10 segundos). Se debe continuar con el proceso de carga y protocolo de cristalización hasta que todas las pajuelas se hallen en la criocámara.

El tiempo entre la colocación del embrión en la placa de EG y el protocolo de cristalización no deber exceder de 10 minutos. No cargar varias pajuelas y luego hacer la cristalización.

Luego de realizar el protocolo de cristalización de la última pajuela, iniciar la segunda fase de enfriamiento a una tasa de 0.5 °C/minuto hasta los -35 °C.

Al alcanzar y finalizar la segunda fase a -35 °C pasar directamente los embriones a las escalerillas y sumergir en nitrógeno líquido.

Descongelación:

La descongelación se realizó exponiendo las pajuelas al medio ambiente por 10 segundos para luego sumergirlas en agua a 30 °C por 30 segundos más.

Lavar los embriones cuatro veces en medio H-SOF y dos veces en SOF suplementado

Luego depositar los embriones en una placa nunc de cuatro pozos, con 500 µL de medio SOF suplementado cubierto con aceite mineral/pozo y previamente atemperada y equilibrada a 38.5 °C, 20% de O₂, 5% CO₂ y humedad relativa a saturación (> 90%), para su evaluación morfológica y posterior puesta en cultivo.

Tratamientos

Se desarrollaron dos tratamientos:

Tratamiento 1: protocolo de vitrificación Minitube (Minitube 2012)

Tratamiento 2: protocolo de congelación lenta (Curtis 2009)

Para cada tratamiento se utilizaron 30 embriones en estadios de B y Be.

Variables Analizadas

Se analizaron las siguientes variables:

Diámetro (µm) de los embriones al momento de la vitrificación-devitrificación y congelación-descongelación

Diámetro (µm) y el porcentaje de reexpansión a las 12, 24, 48 y 72 horas pos devitrificación y descongelación. Se clasificó la reexpansión bajo los criterios de Compacto (≤ 33% de expansión), Parcialmente expandido (>33 a ≤ 70% de expansión), Expandido (>70% de expansión).

Porcentaje de eclosión en fresco a partir del día 7 de cultivo *in vitro* (tomado a las 12, 24, 48 y 72 horas) y pos devitrificación y descongelación (12, 24, 48 y 72 horas).

Porcentaje de embriones con zona pelúcida íntegra (sin fracturas)

Porcentaje de embriones degenerados

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

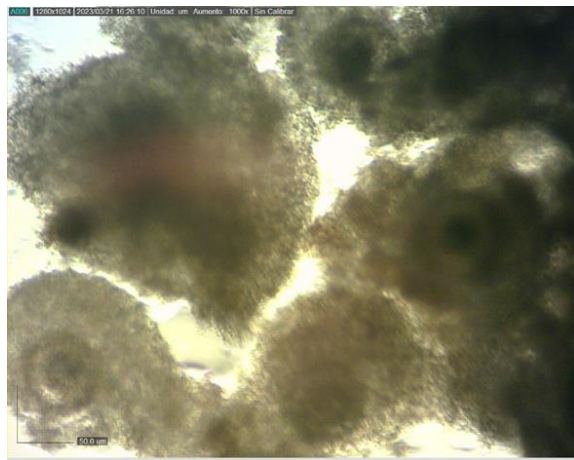
Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos (dos protocolos de criopreservación: vitrificación y congelación lenta) y 30 repeticiones (embriones) por tratamiento. Los valores porcentuales fueron analizados con el procedimiento de distribución de frecuencias utilizando la prueba de Chi-cuadrado (χ^2); los valores numéricos se analizaron con la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) utilizando el modelo lineal general (GLM) y medidas repetidas en el tiempo, separación de medias y la prueba de rangos múltiples de Duncan. Para determinar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Kolmogórov-Smirnov; el valor de significancia exigido fue de $P \leq 0.05$ utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS versión 9.4)

Resultados y Discusión

Para este estudio se utilizaron un total de 46 ovarios procedentes de vacas faenadas de los cuales se extrajeron un total de 186 oocitos y de estos 139 fueron clasificados viables (categorías I y II) para un promedio de oocitos viables/ovario de 3.02. Estos resultados fueron similares en viabilidad de acuerdo con los estudios realizados por Quispe et al. (2018) quienes demostraron que existe un mayor porcentaje de viabilidad de oocitos bovinos recolectados de ovarios de vacas faenadas que por aspiración *in vivo*, esto se atribuye a que estos oocitos no están expuestos a factores que puedan intervenir con su calidad, como lo es el diámetro de la aguja y la presión del vacío de la aspiración según Hashimoto et al. (1999). Los oocitos están menos adheridos a los folículos de los ovarios en estos animales debido a un efecto post mortem y poseen *Cumulus* más completos y en mejor estado (Mullaart et al. 1999)

Figura 5

Grupo de oocitos categoría I al momento de colocarlos a maduración in vitro



En cuanto al porcentaje de maduración *in vitro* (MIV) de 139 oocitos puestos a MIV el 87.05% (121 oocitos) maduraron satisfactoriamente; estos resultados superan los estudios realizados por Báez-Contreras et al. (2010) en donde el porcentaje de maduración fue de 61.36% y 53.85% al evaluar dos métodos de MIV, respectivamente.

En relación con el porcentaje de fertilización *in vitro* (FIV), de los 121 oocitos que lograron MIV satisfactoria, el 76.03% (92 oocitos) lograron FIV correctamente; estos resultados son similares a los

obtenidos por Fernández et al. (2007) quienes demostraron la factibilidad del desarrollo de la implementación de la FIV, en el laboratorio de ciencias veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, en donde la tasa de la fertilización de oocitos bovinos lograda fue del 73.3%. Otros estudios previos como los de Arav (2001), Gutiérrez-Adán et al. (2001), Mayes y Sirard (2001) han indicado que generalmente, entre el 10% y el 40% de los oocitos seleccionados y madurados *in vitro* logran desarrollarse hasta la etapa de blastocisto en sistemas de cultivo *in vitro*. De estos, solo entre el 5% y el 20% logran resultar en gestaciones exitosas. En otro estudio realizado por Arav (2001), se encontró que aproximadamente el 52% de los oocitos sometidos a fertilización *in vitro* lograron dividirse y llegar a la etapa de blastocisto en el desarrollo embrionario. Estos hallazgos resaltan la importancia de obtener un gran número de oocitos para aumentar las posibilidades de lograr gestaciones a partir de un grupo de oocitos recolectados.

De los 92 oocitos fertilizados, 64 de ellos (69.57%) lograron clivaje correcto a las 72 horas. El clivaje es un proceso mitótico en la división celular que marca el inicio del desarrollo embrionario. Durante este proceso, el cigoto se divide y origina dos células conocidas como blastómeros. Estos blastómeros forman la mórula, que posteriormente se desarrolla en una blástula y finalmente en una gástrula. Por otro lado, la apoptosis se refiere a la muerte celular programada según lo señalado por Sánchez (2014). Estos resultados son similares a los obtenidos por Murillo y Matute (2021) en donde utilizando 20% de O₂ en la atmósfera de la incubadora lograron un porcentaje de clivaje de 68.42% y su porcentaje de apoptosis fue de un 31.58% a las 72 horas de evaluar los oocitos, mientras que en el mismo estudio obtuvieron resultados de clivaje de oocitos de 79.38% y porcentajes de apoptosis de 20.62% utilizando 5% de oxígeno en la atmósfera de la cámara.

En el día 7 del desarrollo embrionario bovino, se forma una etapa conocida como blastocisto, que se caracteriza por poseer una cavidad central llena de líquido llamada blastocele. Los blastocistos expandidos presentan una mayor cantidad de líquido en comparación con los blastocistos en etapas tempranas. Con el avance del desarrollo, se produce un blastocisto expandido, el cual se destaca por su aumento en tamaño debido al incremento de líquido en el blastocele. En este proceso, el macizo

celular interno (MCI) se compacta y las células del trofoblasto se adhieren a la zona pelúcida, que a su vez se adelgaza (Mapletoft et al. 2002). De los 54 blastocistos obtenidos en el séptimo día, el 58.7% de ellos se originaron a partir de los oocitos fecundados. La eficiencia general del proceso presentó un 38.85% de los embriones en el séptimo día se generaron a partir de los oocitos viables aspirados; estos resultados son superiores a los obtenidos por Molina-Coto (2017) en su estudio, donde obtuvieron una eficiencia del 29% de blastocistos al día 7.

Valores Medios del Diámetro Externo (μm) de los Blastocistos en Fresco y al Descongelar/Calentar en el Medio de Cultivo *in vitro*.

No existieron diferencias ($P > 0.05$) entre los valores medios del diámetro externo (μm) de los blastocistos en fresco, antes de someterlos al proceso de congelación y vitrificación, de igual manera no hubo diferencias ($P > 0.05$) en el diámetro de los blastocistos congelados durante el proceso de descongelado, sin embargo, en los blastocistos sometidos al proceso de vitrificación y luego al calentamiento, sí hubo diferencia ($P \leq 0.05$) presentando una media de 6.25% menos en el diámetro externo (Cuadro 4; Figura 5).

Cuadro 4

*Valores medios del diámetro externo (μm) de los blastocistos bovinos en fresco y al descongelar/calentar en el medio SOF de cultivo *in vitro*.*

Tratamiento	Diámetro en fresco (μm)	EE \pm	Diámetro al descongelar/calentar (μm)	EE \pm	Valor de P
Congelación	149.25	2.7487	141.61	3.2345	0.0760
Vitrificación	143.89 ^a	2.4317	136.55 ^b	2.5448	0.0407
Valor de P	0.1483		0.2231		

Nota: ^{ab} Medias en filas con letras diferentes, difieren entre sí ($P \leq 0.05$)

Figura 6

Izquierda: Diámetro de blastocito pre-congelación lenta. Derecha: diámetro blastocisto pos-descongelación hora 0.

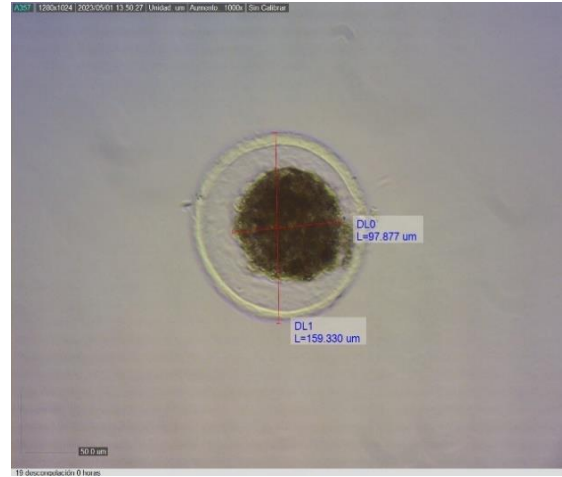
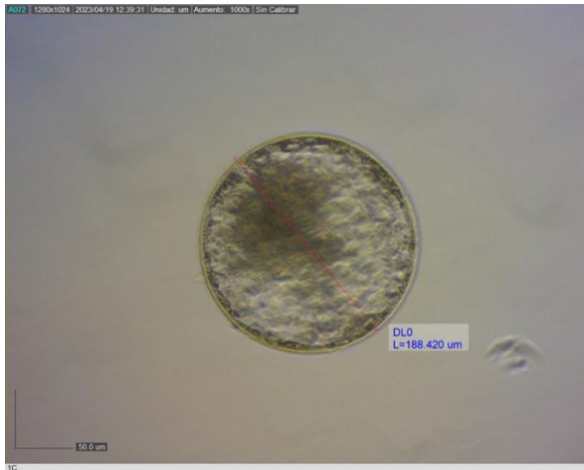


Figura 7

Izquierda: Diámetro de blastocito pre-vitrificación. Derecha: diámetro blastocisto al calentamiento hora 0.

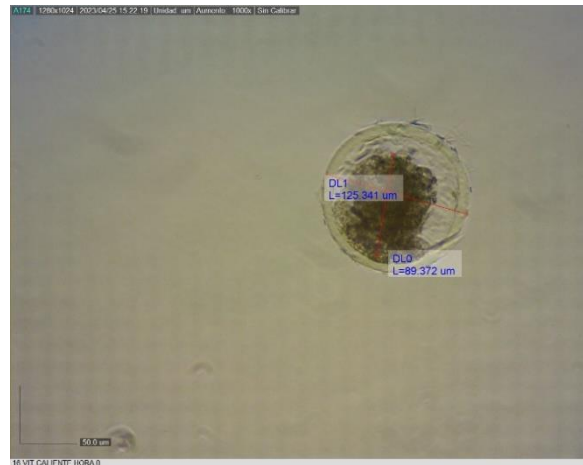
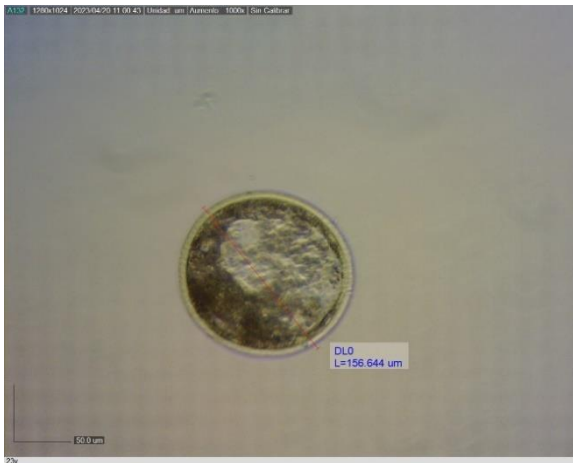
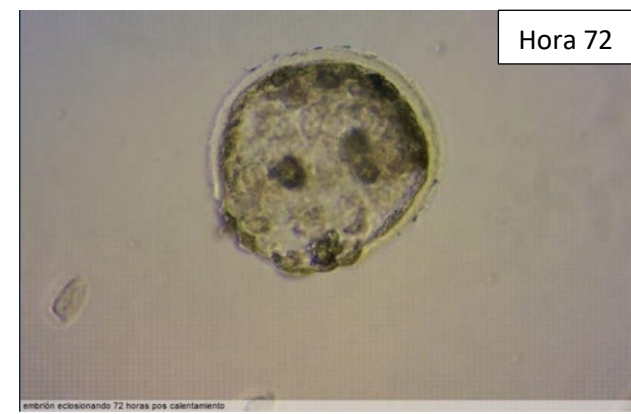
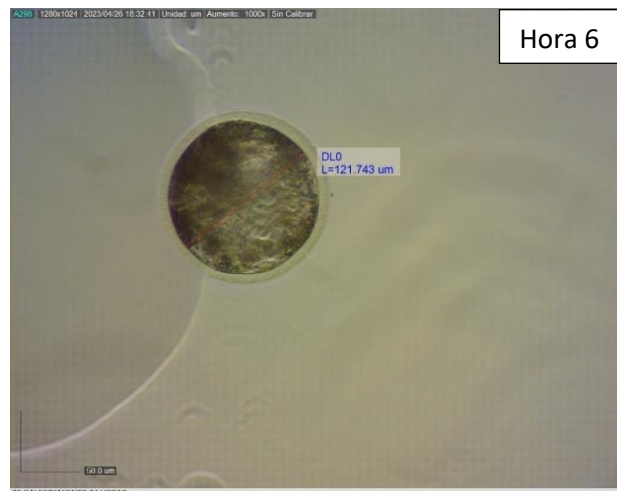


Figura 8

Blastocistos a las diferentes horas pos-calentamiento. La hora cero representa el momento en que se realiza el calentamiento.



Valores Medios del Diámetro (μm) del Macizo Celular Interno (MCI) en Fresco y al Descongelar/Calentar a las 0, 6, 12, 24 y 48 Horas del Cultivo *in vitro*

Evaluar adecuadamente la calidad de los embriones nos proporcionará información precisa sobre el nivel de éxito de la transferencia y la probabilidad de obtener un embarazo satisfactorio (Carballo Guerrero et al. 2009). De acuerdo con Arriaga Valladares (2010), durante el desarrollo del embrión en la etapa de blastocisto, las células del blastómero comienzan a diferenciarse en dos tipos de células: las células del trofoblasto y el macizo celular interno (MCI). Las células del trofoblasto tienen la capacidad de formar la placenta, mientras que el MCI dará origen al feto. Es más sencillo distinguir el MCI cuando el embrión se encuentra en el estado de blastocisto expandido en comparación con etapas anteriores.

Para esta variable se realizaron comparaciones de las medidas de los diámetros en micras (μm) del Macizo Celular Interno (MCI) de los blastocistos, antes del proceso de congelación y el proceso de vitrificación; hubo diferencias ($P \leq 0.05$) en el diámetro del MCI tanto en el tratamiento de congelación como en vitrificación, siendo el diámetro más pequeño el obtenido al momento de la descongelación y/o calentamiento para ambos tratamientos (Cuadro 5), lo que se debe al proceso de deshidratación que sufren los embriones durante el procedimiento de congelación y en el caso de la vitrificación la compactación se debe al rápido enfriamiento el cual disminuye bruscamente el movimiento molecular, de modo que las moléculas de agua no tienen tiempo suficiente para ordenarse y orientarse de acuerdo a sus cargas para formar cristales de hielo; por esta razón los embriones vitrificados mantienen en su soluciones la distribución iónica y molecular de un líquido pero en un estado sobre-enfriado y extremadamente viscoso y sin cambio de fase (Mucci et al. 2006).

Al comparar los dos tratamientos entre sí, hubo diferencia en el tamaño del MCI solo a las seis y 12 horas pos-descongelación y/o calentamiento, sin embargo, en los demás tiempos evaluados los resultados fueron similares, dando al final un rango de MCI a las 48 horas entre 100 y 120 μm para ambos tratamientos.

Cuadro 4

Valores medios del diámetro (μm) del Macizo Celular Interno (MCI) de blastocistos bovinos en fresco y al descongelar/calentar en medio SOF de cultivo *in vitro*.

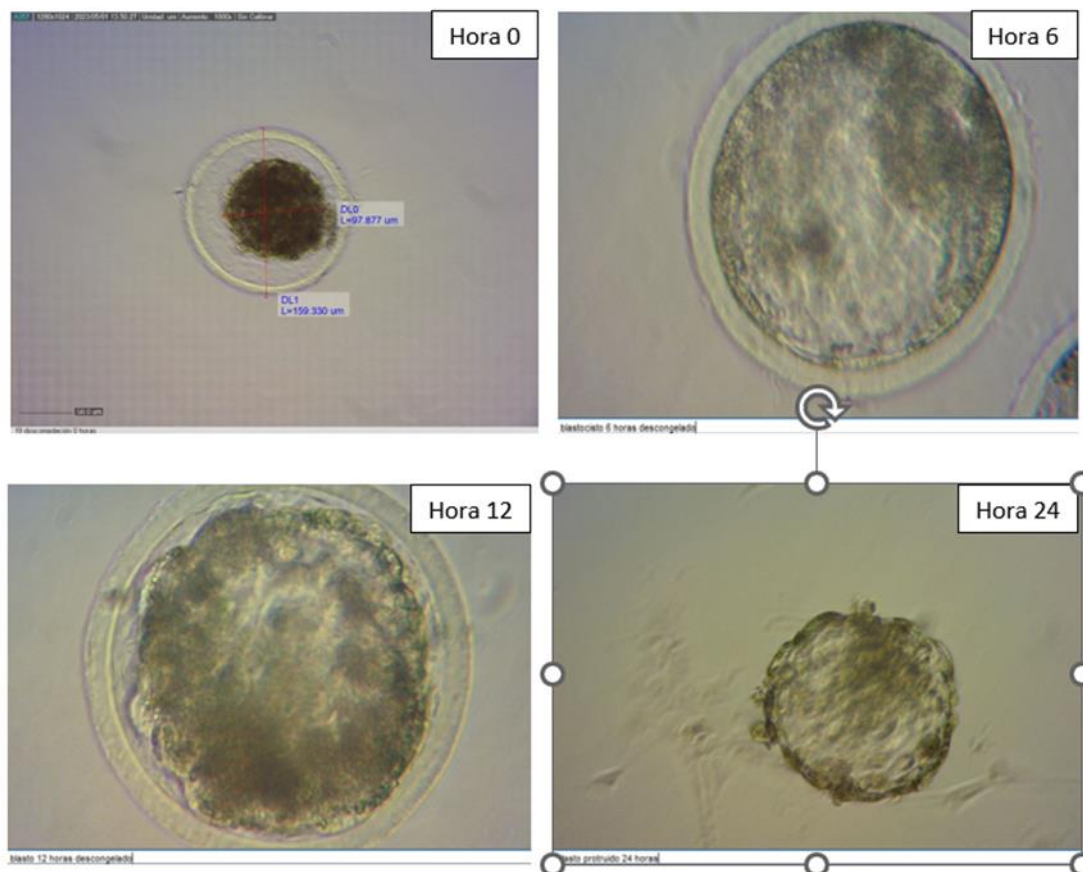
Tiempo (horas) al descongelado / calentamiento	Congelación Diámetro MCI (μm)	EE \pm	Vitrificación Diámetro MCI (μm)	EE \pm	Valor de P
Fresco	126.17 ^a	2.9153	123.78 ^a	2.5791	0.5402
0	98.49 ^b	3.4305	91.62 ^c	2.7657	0.1212
6	110.47 ^{cx}	3.4305	98.43 ^{bcy}	2.6991	0.0065
12	111.50 ^{cx}	3.5706	99.53 ^{bdy}	3.5706	0.0089
24	111.30 ^c	5.0496	107.24 ^{bd}	3.5706	0.5130
48	105.68 ^{bc}	8.7461	111.32 ^d	5.5315	0.5869
Valor de P	≤ 0.05		≤ 0.05		

Nota. ^{abcd} Medias en columnas con letras diferentes, difieren entre sí ($P \leq 0.05$)

^{xy} Medias en filas con letras diferentes, difieren entre sí ($P \leq 0.05$)

Figura 9

Blastocistos a las diferentes horas pos-descongelación. La hora cero representa el momento en que se realiza la descongelación.



Porcentajes (%) del Total del Macizo Celular Interno (MCI) al Descongelar/Calentar a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas de Cultivo *in vitro* con Base en el Diámetro del MCI en Fresco

Se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) dentro de cada procedimiento, en el caso de los embriones congelados lograron entre la hora 0 (descongelación) a la hora 48 de cultivo una recuperación porcentual del 16.24% en expansión del MCI alcanzando un 96.08% total de expansión del MCI en comparación con el diámetro en fresco; por su parte los embriones vitrificados y calentados posteriormente lograron una recuperación del 17.44% en expansión del MCI alcanzando un 93.93% total de expansión del MCI en comparación con el diámetro en fresco, similar a lo obtenido en los embriones congelados/descongelados ($P > 0.05$; Cuadro 6)

Cuadro 5

Valores medios de los porcentajes (%) del total del Macizo Celular Interno (MCI) al descongelar/calentar a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas de cultivo in vitro en medio SOF, con base en el diámetro del MCI en fresco

Tiempo (horas)	Congelación (%)	EE±	Vitrificación (%)	EE±	Valor de P
0	79.84 ^a	0.0395	76.49 ^a	0.0326	0.2774
6	89.65 ^{abx}	0.0411	80.94 ^{ay}	0.0318	0.0462
12	90.17 ^b	0.0429	82.93 ^{ac}	0.0335	0.0616
24	90.91 ^b	0.0636	88.55 ^{cb}	0.0429	0.7788
48	96.08 ^c	0.1424	93.93 ^b	0.0712	0.4539
Valor de P	≤ 0.05		≤ 0.05		

Nota: ^{abcd} Medias en columnas con letras diferentes, difieren entre sí ($P \leq 0.05$)

^{xy} Medias en filas con letras diferentes, difieren entre sí ($P \leq 0.05$)

Porcentajes de Eclosión (Sobrevivencia) de Blastocistos Descongelados/Calentados a las 24, 48 y 72

Horas de Cultivo *in vitro* en Medio SOF

Se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) a las 48 y 72 horas de cultivo *in vitro*; los embriones que fueron vitrificados/calentados presentaron a las 48 horas un 32.04% más de eclosión (sobrevivencia) que los embriones congelados/descongelados y a las 72 horas los embriones vitrificados/calentados superaron en 36.38% a los congelados/descongelados (Cuadro 7). El rango de eclosión en las primeras 24 horas de cultivo *in vitro* estuvo entre 10 y 17.5%. Estos resultados superan a los reportados por Silva y Berland (2004) de 29% de eclosión y los de Lazar et al. (2000) 46% utilizando como crioprotector

etilenglicol 16.5% + DMSO 16.5% + sacarosa 0.5 M; así mismo son similares a los reportados por Kaidi et al. (2001) de 50% utilizando etilenglicol 25% y glicerol 25% como crioprotectores, sin embargo, son inferiores a los resultados obtenidos por Martínez et al. (2002) de 64% quienes utilizaron como crioprotectores etilenglicol 25% + glicerol 25% + Sacarosa 0.5M y los del Pugh et al. (2000) de 70% utilizando etilenglicol 25% y DMSO 25% como crioprotectores, estas diferencias posiblemente se atribuyen a los diferentes medios de cultivo y concentraciones de crioprotectores utilizadas durante el proceso de vitrificación y calentamiento para la extracción de los crioprotectores por los diferentes autores.

Por otra parte, los resultados obtenidos en esta investigación con los embriones obtenidos *in vitro* congelados-descongelados son inferiores a los reportados por Sommerfeld y Niemann (1999) de 30% utilizando como crioprotector etilenglicol 1.8 M; de igual manera son inferiores a los reportados por Khurana y Niemann (2000) de 36% utilizando glicerol al 10% como crioprotector y también son inferiores a los reportados por Abe et al. (2002) de 50% utilizando etilenglicol 1.8 M como agente crioprotector.

Según Najafzadeh et al. (2021), se ha observado que la vitrificación ofrece una tasa de supervivencia de embriones más alta en biopsias de blastocistos obtenidos mediante fecundación *in vitro* (IVP) en comparación con la congelación lenta. La evaluación de la tasa de supervivencia se realizó cinco horas después de la biopsia o después del proceso de descongelación/calentamiento, utilizando la formación de coágulos de blastocistos como indicador. En el grupo B (biopsia de blastocistos), se registró una tasa de supervivencia del 94% (307 de 326 blastocistos). En contraste, en el grupo VB (vitrificación de blastocistos), la tasa de supervivencia fue del 86% (138 de 161), lo cual resultó significativamente superior en comparación con el grupo FBS (congelación lenta), que obtuvo un 57% de supervivencia (81 de 142).

Durante la criopreservación, los embriones están expuestos a diversos tipos de daños ultraestructurales, los cuales son difíciles de considerar por separado ya que en muchos casos operan en conjunto. Los principales efectos nocivos podrían deberse a formación de hielo intra o extracelular,

aumento o disminución excesiva del volumen celular por efecto osmótico, efecto tóxico de los crioprotectores, alteraciones en las membranas celulares, fractura embrionaria o de la zona pelúcida, cambios de pH (Mucci et al. 2006).

Cuadro 6

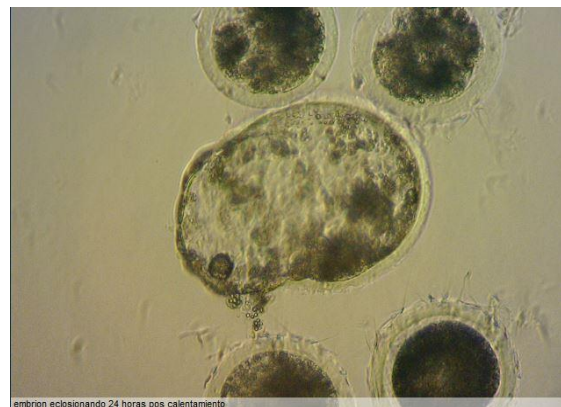
Valores medios de los porcentajes de eclosión (sobrevivencia) de blastocistos congelados-descongelados y vitrificados-calentados a las 24, 48 y 72 horas de cultivo in vitro en medio SOF

Tratamiento	Eclosión (%)		
	24 horas	48 horas	72 horas
Congelación	10.53	15.79	15.79
Vitrificación	17.39	47.83	52.17
Valor de P	0.5269	0.0284	0.0143

Nota. Valor de significancia $P \leq 0.05$

Figura 10

Blastocistos eclosionando, a las 24 horas pos-calentamiento



Porcentajes de Blastocistos con Zona Pelúcida Integra (ZP) y Degenerados a las 24, 48 y 72 Horas de Cultivo *in vitro*

Con respecto a la integridad de la zona pelúcida (ZP) hubo diferencias ($P \leq 0.05$) siendo los embriones sometidos a vitrificación-calentamiento los que presentaron la mayor integridad de la ZP superando a los congelados-descongelados en 27.23% (Cuadro 8). Estos resultados son similares a los reportados por Silva y Berland (2004) de 4.8% de fractura de ZP en embriones vitrificados-calentados mientras que en la presente investigación fue de 4.35%, sin embargo, Vajta et al. (1997) reportan solo

un 1% de fractura de ZP. Por otra parte en referencia a la fractura de ZP en embriones congelados-descongelados, en esta investigación se obtuvo un 31.58% de fractura de ZP superior a lo reportado por Vajta et al. (1997) entre 20 a 27% atribuyendo el daño en la ZP durante el proceso de congelación lenta-descongelación cuando los embriones son rápidamente descongelados lo que permite la nucleación de las moléculas de agua, además, posiblemente por un desequilibrio entre la concentración del crioprotector y la tasa de descenso térmico (Kasai et al. 2002). Otros autores concluyen que las lesiones de la ZP se atribuyen a las diferencias en la expansión de los cristales de hielo (Lehn-Jensen y Rall 1983) por lo cual se originan una serie de cambios anormales en el volumen de los medios de criopreservación durante un rápido cambio de fase (Rall y Meyer 1989). Durante la congelación lenta se considera que más del 50% de los embriones pueden ser físicamente dañados si las tasas de descenso-ascenso térmico durante la congelación-descongelación no son adecuadamente ajustadas (Kasai 1996). Durante la vitrificación-calentamiento, al no producirse cambios de fase, la incidencia de este tipo de daños en ZP es menor (Kasai 1996). Esta lesión es más frecuente durante el calentamiento, y se produciría por el rápido pasaje a través de la temperatura en la cual se forma la fase vítrea (-110 a -135 °C).

Con respecto a los blastocistos degenerados no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) atribuido este resultado al bajo número de blastocistos degenerados en ambos tratamientos (Cuadro 8). Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación con los blastocistos vitrificados-calentados son mejores a los reportados por Guerra et al. (2012) quienes observaron que, tanto a las 12 horas como a las 24 horas de cultivo *in vitro*, independientemente de la procedencia de los embriones (*in vivo* o *in vitro*), los embriones sometidos al proceso de vitrificación-calentamiento mostraron un mayor porcentaje de degenerados. Este efecto fue aún más pronunciado en los embriones producidos *in vitro* y sometidos a la vitrificación, con más del 50% de los embriones degenerados a las 24 horas de cultivo.

En el estudio realizado por Serrano Novoa et al. (2002), utilizando embriones obtenidos *in vitro*, observaron que los porcentajes de embriones degenerados a las 12 horas de cultivo fueron del

36.6% para la técnica de congelación lenta y del 40.2% para la vitrificación. Sin embargo, en nuestro estudio, los embriones criopreservados mediante congelación lenta presentaron un porcentaje menor de degeneración a las 12 horas de 5.26%, y los vitrificados-calentados de 4.35% lo cual difiere de los resultados encontrados por Serrano Novoa et al. (2002).

Cuadro 7

Valores medios de los porcentajes de blastocistos congelados-descongelados y vitrificados-calentados con zona pelúcida íntegra (ZP) y degenerados a las 24, 48 y 72 horas de cultivo in vitro en medio SOF.

Tratamiento	ZP íntegra (%)	Degenerados 6 horas (%)	Degenerados 12 horas (%)	Degenerados 24 horas (%)	Degenerados 48 horas (%)	Degenerados 72 horas (%)
Congelación	68.42	0	5.26	26.32	42.11	42.11
Vitrificación	95.65	4.35	4.35	17.39	17.39	26.09
Valor de P	0.0184	0.3576	0.8897	0.4829	0.0776	0.2730

Nota. Valor de significancia $P \leq 0.05$

Figura 11

Blastocistos con zona pelúcida (ZP) fracturada. La flecha indica la zona de fractura

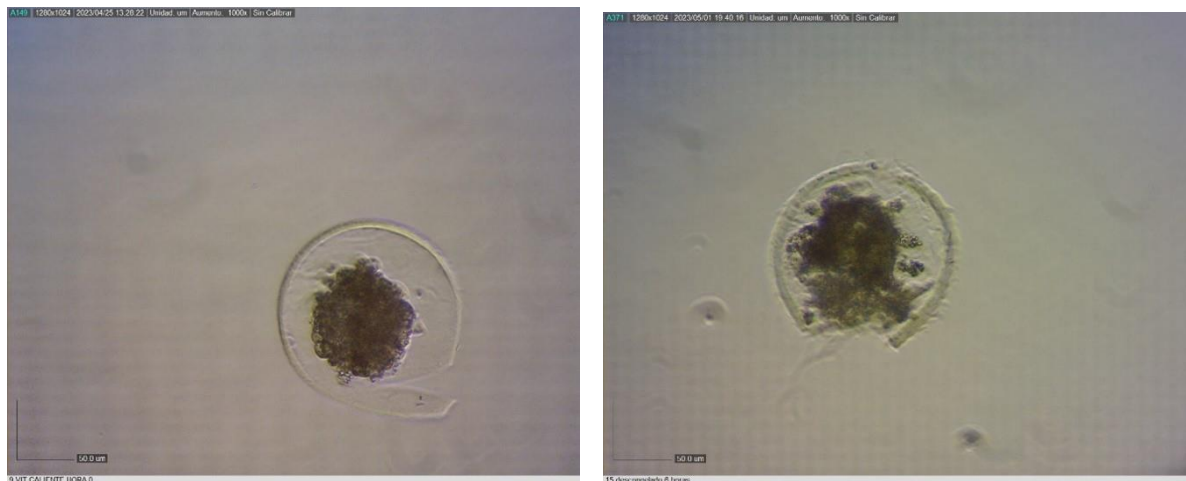
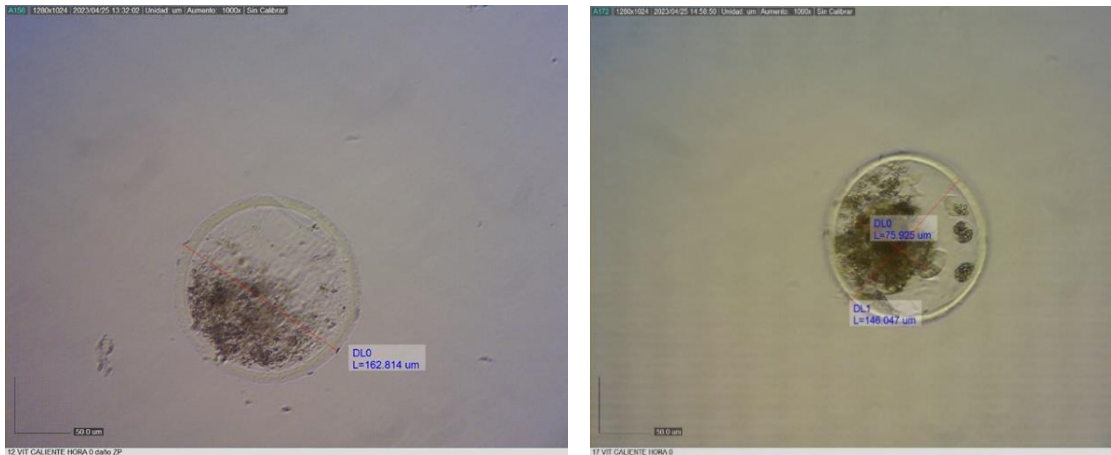


Figura 12

Blastocistos degenerados. Izquierda: nótese la disgregación severa del MCI. Derecha: nótese las abundantes células picnóticas, presencia de vesículas lipídicas y desprendimiento total de los blastómeros.



Clasificación de los Blastocistos de Acuerdo con el Porcentaje de Expansión a las 6, 12, 24 y 48

Horas de Cultivo *in vitro*

No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre los diferentes tiempos de evaluación entre tratamientos (Cuadro 9). Estos resultados son similares a los reportados por Silva y Berland (2004) de 46% de expansión a las 24 horas en blastocistos vitrificados-calentados, sin embargo, los resultados de esta investigación son inferiores a los reportados por Lazar et al. (2000) de 69.2%, Cho et al. (2002) de 79.6%, Vajta et al. (1998) de 81% para blastocistos vitrificados-calentados expandidos a las 48 horas. Por otra parte, Ratto et al. (1998) reportan tasas de expansión del 63% a las 24 horas para blastocistos obtenidos *in vivo* y vitrificados-calentados.

Sin embargo, en el estudio realizado por Tshimangadzo et al. (2004) investigaron el efecto de dos medios de cultivo diferentes, KSOM (medio optimizado de potasio simple) y KSOM + SOF (medio optimizado de potasio simple + fluido de oviducto sintético), en el cultivo *in vitro* y vitrificación de blastocistos. Los blastocistos fueron cultivados durante diferentes períodos de tiempo (seis días, 6.5 días y 7.5 días) antes de ser vitrificados. Los resultados mostraron que las tasas de reexpansión a las seis horas después de la vitrificación variaron en función del medio de cultivo utilizado. En el grupo de

blastocistos cultivados en KSOM, se observaron tasas de reexpansión de $68 \pm 5\%$, $52 \pm 4\%$ y $49 \pm 5\%$ para los períodos de cultivo de seis días, 6.5 días y 7.5 días, respectivamente. En contraste, en el grupo de embriones cultivados en KSOM + SOF, se obtuvieron tasas de reexpansión de $68 \pm 5\%$, $87 \pm 4\%$ y $52 \pm 5\%$ para los mismos períodos de tiempo. Estos resultados indican que el medio KSOM + SOF mostró tasas de reexpansión generalmente más altas que el KSOM en este estudio. Esto puede deberse a las diferencias en la composición de los medios de cultivo utilizados, que pueden proporcionar diferentes nutrientes y factores de crecimiento necesarios para la supervivencia y el desarrollo de los blastocistos vitrificados. En el contexto del presente estudio, los resultados obtenidos difieren de los de Tshimangadzo et al. (2004) posiblemente debido al uso de medios de cultivo enriquecidos diferentes.

Otro estudio llevado a cabo por Serrano Novoa et al. (2002), se compararon dos métodos de criopreservación, la congelación lenta (CL) y la vitrificación (V), en términos de su impacto en la calidad (morfología y nuclearidad) de embriones bovinos producidos *in vitro*. Los blastocistos de excelente calidad (90-100 células) fueron criopreservados utilizando la CL (77 embriones) y la V (50 embriones) y posteriormente evaluados mediante microscopía óptica después del descongelamiento y a las 12 horas de cultivo *in vitro*. Se registraron la morfología y la nuclearidad de los embriones en las categorías de compacto, parcialmente expandido, expandido, picnótico y fragmentado, con <40, 40-60, 61-80 y >80 núcleos, respectivamente.

Al momento del descongelamiento, los embriones parcialmente expandidos mostraron tener menos de 40 núcleos. Los embriones compactos y expandidos presentaron la mayor cantidad de núcleos (61-80; >80, respectivamente). Un 57.3% de los embriones tenía menos de 40 núcleos. El 17.7% de los embriones tenía más de 60 núcleos. A las 12 horas, el 36.6% de los embriones presentó más de 60 núcleos, lo que representa un aumento del 132.7% durante el cultivo. No se observaron diferencias entre las técnicas de criopreservación ($P > 0.05$) en ninguna de las fases.

Al evaluar conjuntamente ambas fases, se observó que todos los embriones con más de 60 núcleos al descongelamiento aumentaron su nuclearidad durante el cultivo, mientras que algunos

embriones (20%) con una baja nuclearidad inicial alcanzaron más de 60 núcleos. Aunque estos embriones mostraron expansión, también presentaron picnosis. Los embriones con menos de 40 núcleos exhibieron compactación y picnosis, mientras que los embriones con 40-60 núcleos, aunque se expandieron, también mostraron picnosis y fragmentación.

Cuadro 8

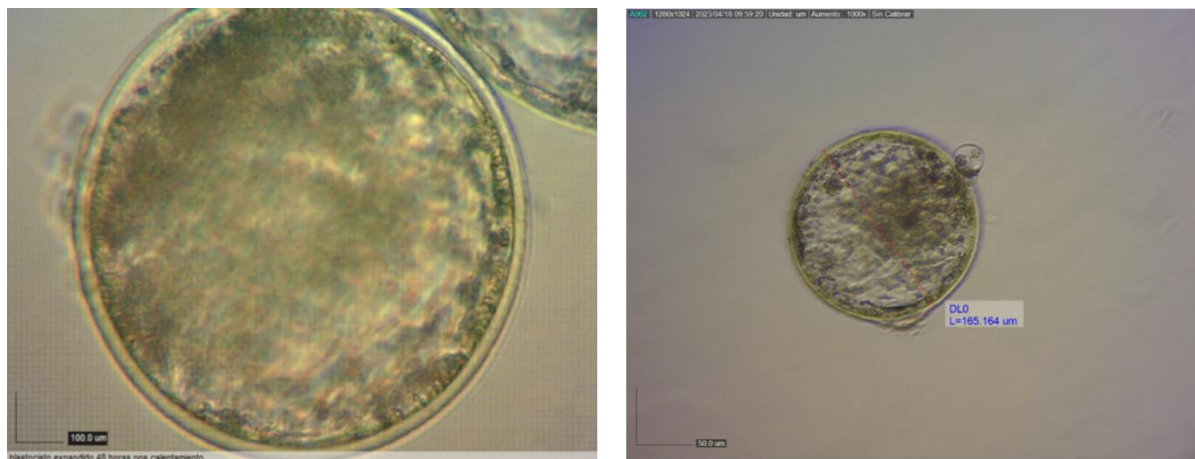
Clasificación de los blastocistos de acuerdo con el grado de expansión y a las horas de cultivo in vitro en medio SOF.

Tratamiento	Compacto (%)	Parcialmente expandido (%)	Expandido (%)
6 horas			
Congelación	41.67	33.33	25
Vitrificación	35.71	50	14.29
Valor de P	0.6474		
12 horas			
Congelación	36.36	36.36	27.27
Vitrificación	33.33	40	26.67
Valor de P	0.9804		
24 horas			
Congelación	20	60	20
Vitrificación	20	40	40
Valor de P	0.7097		
48 horas			
Congelación	0	50	50
Vitrificación	0	40	60
Valor de P	0.8091		

Nota. Clasificación del porcentaje de expansión: Compacto: $\leq 33\%$ de expansión; Parcialmente expandido >33 a $\leq 70\%$ de expansión; Expandido $>70\%$ de expansión (clasificación elaborada por los autores con base en revisión de literatura).

Figura 13

Blastocistos pos-calentamiento y listos para ser transferidos a las receptoras



Conclusiones

El diámetro externo de los embriones sometidos a congelación lenta y descongelación fue similar, sin embargo, en los embriones sometidos a vitrificación y luego al calentamiento el diámetro externo disminuyó un 5.1%.

Bajo las condiciones de ese estudio, el diámetro del MCI al momento del descongelamiento o calentamiento fue similar entre tratamientos, sin embargo, los embriones descongelados presentaron un mayor diámetro entre las seis y 12 horas de iniciado el proceso.

El mayor porcentaje de expansión de los embriones sometidos a congelación lenta/descongelación y vitrificación/calentamiento se obtuvo a las 48 horas para ambos tratamientos.

El protocolo de vitrificación/calentamiento presentó el mejor porcentaje de eclosión (sobrevivencia) a las 72 horas superando el 50%.

El porcentaje de embriones degenerados fue similar entre los tratamientos mientras que el mayor porcentaje de embriones con zona pelúcida íntegra se obtuvo con el protocolo de vitrificación/calentamiento.

Recomendaciones

Se recomienda la aplicación del método de criopreservación por vitrificación de embriones producidos bajo condiciones *in vitro* en el laboratorio de biotecnología de la reproducción animal de Zamorano.

Realizar futuras investigaciones transfiriendo a las receptoras los embriones vitrificados/calentados para evaluar las tasas de preñez

Evaluar diferentes medios de criopreservación (diferentes concentraciones de crioprotectores) aplicados a la vitrificación.

Referencias

- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 61(1):57–66. eng. doi:10.1002/mrd.1131.
- Arav A. 2001. Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 55(7):1561–1565. eng. doi:10.1016/s0093-691x(01)00502-7.
- Arriaga Valladares J. 2010. Transferencia de Embriones en Bovinos. Revisión [Tesis universitaria]. Michoacan, México: Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo; [consultado el 13 de jul. de 2023].
- Báez-Contreras FJ, Chávez-Corona AC, Hernández-Fonseca HJ, Villamediana-Monreal PC. 2010. Evaluation of *in vitro* development capacity of bovine oocytes obtained from predominantly *Bos taurus* and *Bos indicus* cows. *Revista Científica*; [consultado el 14 de jul. de 2023]. 20(3):259–267. en.
- Carballo Guerrero D, Tríbulo A, Tríbulo R, Tríbulo H, Bó GA. 2009. 291 Superovulatory response in beef cattle treated during the first follicular wave following synchronization of ovulation with a progestin device and GnRH. *Reprod. Fertil. Dev*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 21(1):242. en. <https://www.publish.csiro.au/rd/rdv21n1ab291>. doi:10.1071/RDv21n1Ab291.
- Serrano Novoa César, Sierra Rosa, Sánchez Juan E., Restrepo Betancur Luis Fernando, Olivera Ángel Martha. 2002. Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos *in vitro*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 15(3):286–292. spa. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3242403>.
- Cho S-K, Cho S-G, Bae I-H, Park C-S, Kong I-K. 2002. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim Reprod Sci*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 73(3-4):151–158. eng. doi:10.1016/s0378-4320(02)00132-x.

[FAO] Food and Agriculture Organization. 2019. ¿Por qué es importante la genética animal?: ¿Qué son los recursos zoogenéticos? [Beneficios y amenazas sobre los recursos zoogenéticos]. [sin lugar]: [sin editorial]; [consultado el 13 de jul. de 2023]. <https://www.fao.org/animal-genetics/background/why-is-ag-important/es/>.

Fernández, V, Álvarez, Urbán Duarte D, Fragoso Islas A, Asprón Pelayo MA, Rios Utrera A, Pérez Reynozo S, La Torre Sánchez JF de. 2021. Biotecnologías reproductivas en el ganado bovino: cinco décadas de investigación en México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 12:39–78. doi:10.22319/rmcp.v12s3.5918.

Fernández A, Díaz T, Muñoz G. 2007. Producción *In vitro* de embriones bovinos *In vitro* Production of Bovine Embryos. *Revista Facultad de Ciencias Veterinarias*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 48(1). <https://ve.scielo.org>.

Guerra R, Solis A, Sandoya G, Armas R de. 2012. Evaluación de tres protocolos de criopreservación de embriones bovinos obtenidos *in vivo* e *in vitro*. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 13(10). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63624631005>.

Gutiérrez-Adán A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, La Fuente J de. 2001. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 55(5):1117–1126. eng. doi:10.1016/s0093-691x(01)00471-x.

Hashimoto S, Takakura R, Kishi M, Sudo T, Minami N, Yamada M. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine *Cumulus*-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 51(4):757–765. eng. doi:10.1016/s0093-691x(99)00024-2.

Hasler JF. 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 81(1):152–169. eng. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24274419/>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.010.

- Hernández-Pichardo JE, Moreno-Peña LK, Navarro-Maldonado MdC, Ambriz-García DA, Rodríguez-Suástegui JL. 2018. Ventajas de la vitrificación con relación a la congelación en eyaculados de ovino. *Revista Salud Animal*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 40(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000100001.
- Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I. 2001. Effect of conventional controlled rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Biol Reprod*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 65(4):1127–1134. eng. doi:10.1095/biolreprod65.4.1127.
- Kasai M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 42(1-4):67–75. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378432096015369>. doi:10.1016/0378-4320(96)01536-9.
- Kasai M, Ito K, Edashige K. 2002. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum Reprod*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 17(7):1863–1874. eng. doi:10.1093/humrep/17.7.1863.
- Khurana NK, Niemann H. 2000. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. *Theriogenology*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 54(2):313–326. eng. doi:10.1016/s0093-691x(00)00351-4.
- Lazar L, Spak J, Dávid V. 2000. The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 54(4):571–578. eng. doi:10.1016/S0093-691X(00)00372-1.
- Lehn-Jensen H, Rall WF. 1983. Cryomicroscopic observations of cattle embryos during freezing and thawing. *Theriogenology*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 19(2):263–277. eng. doi:10.1016/0093-691x(83)90013-4.
- Mapletoft RJ, Steward KB, Adams GP. 2002. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod Nutr Dev*. 42(6):601–611. eng. doi:10.1051/rnd:2002046.

- Martínez AG, Valcárcel A, las Heras MA de, Matos DG de, Furnus C, Brogliatti G. 2002. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Anim Reprod Sci*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 73(1-2):11–21. eng. doi:10.1016/s0378-4320(02)00121-5.
- Mayes MA, Sirard MA. 2001. The influence of *Cumulus*-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 55(4):911–922. eng. doi:10.1016/s0093-691x (01)00453-8.
- Molina-Coto R. 2017. El estrés calórico afecta el comportamiento reproductivo y el desarrollo embrionario temprano en bovinos. *Nutri. Anim. Trop.* 11(1):1. es. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/nutrianimal/article/view/28280/0>. doi:10.15517/nat. v11i1.28280.
- Mucci N, Aller JF, Kaiser GG, Hozbor F, Alberio RH. 2006. Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Arch. med. vet*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 38(2). doi:10.4067/S0301-732X2006000200002.
- Mullaart E, Verbrugge A, Merton JS, Aerts B. 1999. Optimization of OPU procedure: In Proceedings of the 15th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association. [sin lugar]: [sin editorial] ; [consultado el 13 de jul. de 2023]. https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Proceedings+of+the+15th+Meeting+European+Embryo+Transfer+Association&title=Optimization+of+the+OPU+procedure&author=E.+Mullaart&author=A.+Verbrugge&author=B.+Aerts&author=J.S.+Merton&pages=216&.
- Murillo P. DS, Matute L. JM. 2021. Efecto de dos concentraciones de O₂ en la producción *in vitro* de embriones bovinos [Proyecto Especial de Graduación]. Honduras: Zamorano; [consultado el 13 de jul. de 2023]. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/7105>.
- Najafzadeh V, Bojsen-Møller Secher J, Pihl M, Aerenlund A, Jørgensen N, Jensen KK, Jensen MT, Fenner MF, Strøbech L, Hyttel P. 2021. Vitrification yields higher cryo-survival rate than slow freezing in biopsied bovine *in vitro* produced blastocysts. *Theriogenology*. 171:44–54. eng. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34023618/>. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.04.020.

- Pugh PA, Tervit HR, Niemann H. 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and in vivo following transfer. *Anim Reprod Sci*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 58(1-2):9–22. eng. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10700641/>. doi:10.1016/s0378-4320(99)00087-1.
- Quispe E. C, Ancco G. E, Solano A. J, Unchupaico P. I, Mellisho S. E. 2018. Capacidad de desarrollo embrionario de ovocitos de bovino recuperados vía ultrasonografía y de ovarios de matadero. *Revista investigativa veterinaria Perú*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 29(4). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000400004.
- Rall WF, Meyer TK. 1989. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 31(3):683–692. eng. doi:10.1016/0093-691x (89)90251-3.
- Ratto M, Berland M, Silva M, Matamoros R. 1998. Vitrificación de embriones bovinos: Antecedente preliminar. *Archivos Medicina Veterinaria*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 30:187–188. <https://scholar.google.es/citations?user=ojrt-w0aaaaj&hl=es&oi=sra>.
- Mapletoft RJ. 1998. The effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. [sin lugar]: [sin editorial]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc1189501/>.
- Sánchez S. 2014. Comparación de dos medios de cultivo *in vitro*: CR1aa y SOF sobre la producción de embriones bovinos en el Laboratorio de Reproducción Animal de Zamorano [Tesis universitaria]. Honduras: Zamorano; [consultado el 13 de jul. de 2023]. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/3494>.
- Seidel GE. 1996. Cryopreservation of equine embryos. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 12(1):85–99. eng. doi:10.1016/s0749-0739(17)30296-1.
- Silva ME, Berland MA. 2004. Vitrificación de blastocitos bovinos producidos *in vitro* con el método Open Pulled Straw (OPS): Primer reporte*. *Arch. med. vet*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 36(1). doi:10.4067/S0301-732X2004000100009.

- Sommerfeld V, Niemann H. 1999. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 38(2):95–105. eng. doi:10.1006/cryo.1999.2159.
- Tshimangadzo NL, Dinnyés A, Yang X, Tian XC. 2004. Bovine blastocyst development *in vitro*: timing, sex, and viability following vitrification. *Biol Reprod.* 71(5):1671–1676. eng. doi:10.1095/biolreprod.104.027987.
- 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. *Mol Reprod Dev*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 51(1):53–58. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199809)51:1<53:AID-MRD6>3.0.CO;2-V.
- Vajta G, Hyttel P, Callesen H. 1997. Morphological changes of in-vitro-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. *Mol Reprod Dev.* 48(1):9–17. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199709)48:1<9:AID-MRD2>3.0.CO;2-N.
- Wit AA de, Wurth YA, Kruip TA. 2000. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine *Cumulus*-oocyte complex. *J Anim Sci*; [consultado el 13 de jul. de 2023]. 78(5):1277–1283. eng. doi:10.2527/2000.7851277x.

Anexos

Anexo A

Lavado y acondicionamiento de ovarios recolectados.



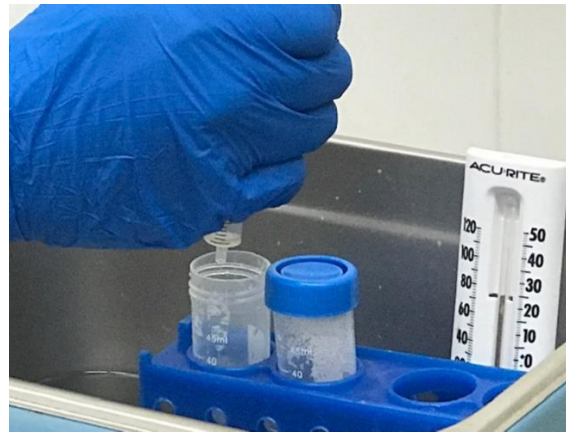
Anexo B

Aspiración folicular



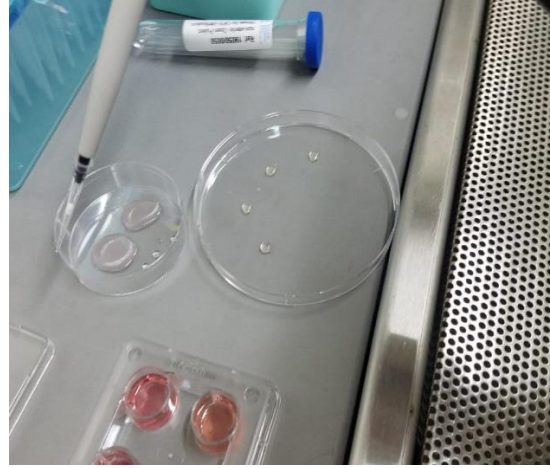
Anexo C

Maduración in vitro (MIV): deposición de fluido folicular en baño maría.



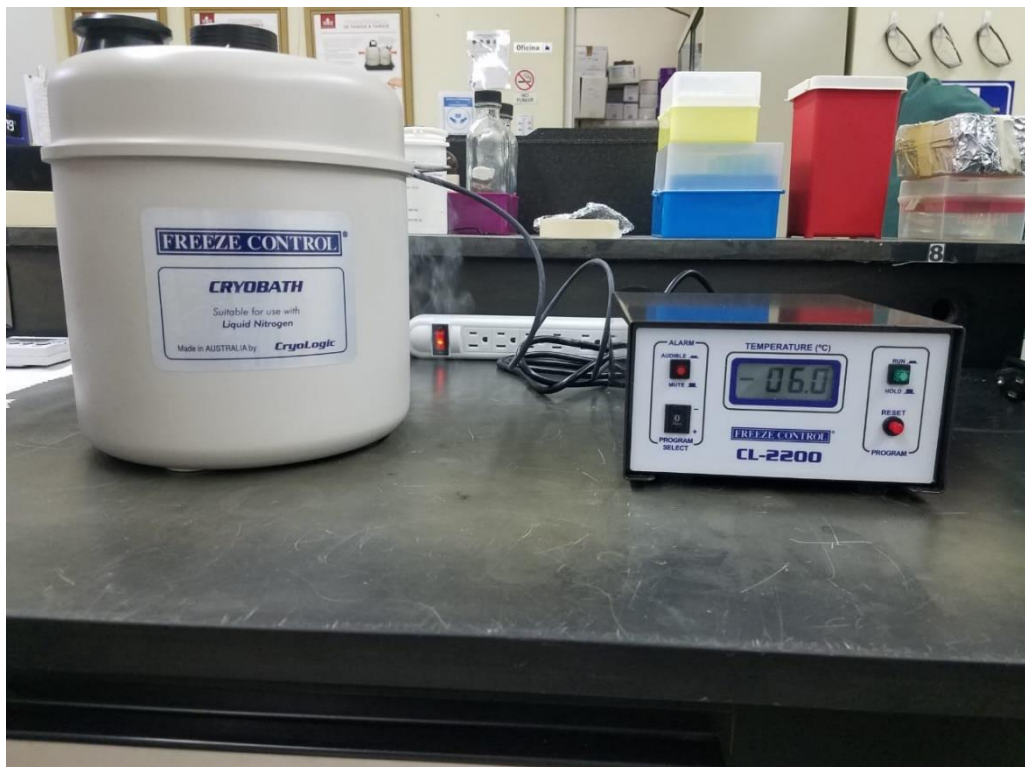
Anexo D

Lavado en medio FIV



Anexo E

Equipo para la congelación lenta CRYOLOGIC® modelo CL 2200 Standard System



Anexo F

Proceso de vitrificación

