

**La vitrificación como alternativa para la criopreservación de oocitos y embriones
equinos y bovinos**

**Trabajo de grado para optar por el título de Especialista en Biotecnología de la
Reproducción en Grandes Especies Animales**

José Julian Ceballos

Eloísa Echeverri Farley

Roberto Zuluaga

Asesor:

Catalina Vélez

Corporación Universitaria Lasallista

Facultad Ciencias Administrativas y Agropecuarias

Especialización en Biotecnología de la Reproducción en Grandes Especies

Animales

Caldas - Antioquia

2018

Tabla de contenido

Introducción	4
Justificación	7
Objetivos	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Marco teórico	10
Criopreservación	10
Crioprotectores	12
Criopreservación de oocitos	15
Criopreservación de embriones	21
Metodología	29
Conclusiones	30
Perspectivas	31
Bibliografía	¡Error! Marcador no definido.

Lista de tablas

Tabla 1	27
Tabla 2	27
Tabla 3	28
Tabla 4	28

Introducción

La transferencia de embriones (TE) en bovinos y equinos se desarrolló a principios de los años 70 y es una técnica que actualmente se usa a gran escala. (Phillips y Jahnke, 2016).

Inicialmente la transferencia de embriones se realizaba quirúrgicamente lo que producía una menor utilización de la técnica. El advenimiento de la transferencia no quirúrgica a través del cérvix en los años 80 provocó un auge de la TE y su propagación en ambas especies. (Phillips y Jahnke, 2016; Squires, 2016). Sin embargo, el desarrollo de la súperovulación en bovinos que permite la colección de un promedio de 6 a 10 embriones por lavado uterino (Squires, 2016), por esta razón se forjó la necesidad de desarrollar la criopreservación de embriones en esta especie; caso contrario a lo que sucede con la especie equina en la cual la técnica de súperovulación no es eficiente obteniendo solamente un embrión por lavado y con tasas de recuperación que pueden estar entre el 50% y 70%. (Squires, 2016; Diaz, Bondioli, Paccamonti y Gentry, 2015)

El manejo de oocitos y embriones criopreservados presenta grandes ventajas, entre ellas permitir el transporte de material genético con menos riesgos para la salud al transportar embriones congelados y no animales vivos, controlando también la propagación de enfermedades infecciosas (Squires, 2016; Keros y Fuller, 2015), minimiza el número de receptoras necesarias para el procedimiento de transferencia de embriones disminuyendo costos (Squires, 2016; Keros y Fuller, 2015), además que permite la creación de bancos genéticos. (Squires, 2016; Keros y Fuller, 2015)

La criopreservación también facilita el almacenamiento de los embriones mientras animales jóvenes son probados desde su valía genética y se aprovecha su capacidad reproductiva mientras están en su edad de mayor potencial (Squires, 2016), además se podrían realizar biopsias embrionarias antes de la transferencia que permitan determinar la presentación de enfermedades genéticas y sexar los embriones.

La criopreservación mantiene la viabilidad y la funcionalidad celular a temperaturas bajas, para lograr esto se deben entender los efectos que tienen las bajas temperaturas sobre las células ya que el tiempo de duración es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas. El frío prolonga el tiempo biológico porque hace más lentas estas reacciones, sin embargo, este proceso puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas que pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula - célula. (Woods, Benson, Agca y Critsera, 2004). Obtener el protocolo ideal para criopreservar depende del conocimiento sobre las propiedades fisicoquímicas de las células ya que la especie, tipo y estadio celular son factores que pueden afectar el proceso. (Ávilla-portillo et al., 2006)

Hoy en día existen dos metodologías para la criopreservación del material genético de la hembra (Squires, 2016; Phillips y Jahnke, 2016), la primera es la vitrificación, procedimiento mediante el cual se logra la congelación rápida de oocitos o embriones (Squires, 2016). Para este procedimiento se utilizan altas concentraciones de crioprotectores evitando la formación de cristales intracelulares y preservando la arquitectura intracelular de las membranas (Squires, 2016). La otra metodología utilizada para la criopreservación de oocitos y embriones es la congelación lenta, que consiste en

el remplazo lento del agua intracelular, por un crioprotector el cual ingresa a la célula debido a la presión osmótica extracelular (Squires, 2016), la cual es comúnmente usada en la especie bovina. (Phillips y Jahnke, 2016)

En este trabajo se pretende hacer una revisión actualizada de la literatura acerca de los adelantos en la criopreservación de embriones y oocitos en la especie bovina y equina, con la finalidad de recopilar información útil que permita determinar si el crecimiento de la vitrificación durante los últimos años permitirá posicionarla como el método de criopreservación de elección, comparando resultados de investigaciones entre las dos técnicas y de esta manera tratar de inferir cual es más ventajosa o determinar en qué casos podría usarse una u otra técnica de criopreservación.

Justificación

El desarrollo de las biotecnologías reproductivas, así como el incremento de su eficiencia durante las últimas décadas ha provocado un crecimiento en la producción de material germinal y embrionario haciendo necesario el desarrollo de la criopreservación para lograr el almacenamiento seguro para la vida de gran parte de dicho material.

Actualmente el 60% de los embriones bovinos son criopreservados (Squires, 2016) y esto se debe en gran parte al acelerado y exitoso desarrollo de biotecnologías como la súperovulación y la fertilización in vitro. Aunque por otro lado, en los equinos solo el 5% de los embriones son congelados (Squires, 2016), cada día se hace más necesario en esta especie generar estandarización de una técnica confiable de criopreservación que permita el mayor desarrollo de técnicas como la aspiración folicular y la inyección intracitoplasmática de espermatozoides lo que facilitaría el manejo de receptoras disminuyendo los costos por el mantenimiento y manejo de las mismas.

Dentro de las técnicas de criopreservación, la vitrificación ha tenido un crecimiento acelerado durante la última década, basado en la teoría de que el descenso ultrarrápido de la temperatura en conjunto con la utilización de altas concentraciones de crioprotectores protegerá a las diferentes estructuras celulares de daño mecánico causado por la formación de cristales de hielo, los cuales se forman con mayor facilidad durante curvas lentas de enfriamiento que es la base de la técnica de congelación lenta. Demostrando la vitrificación ser la técnica de mayor utilización y eficiencia en criopreservación de oocitos y embriones humanos. (Vanderzwalmen et al., 2015; Pegg, 2015)

Durante los últimos años se han desarrollado múltiples investigaciones las cuales no han sido compiladas en un resumen y analizadas. Esto ha dificultado conocer los diferentes resultados obtenidos con la utilización de distintas técnicas de criopreservación aplicadas a oocitos y embriones equinos y bovinos. Así mismo, no se han podido comparar las diferentes opciones existentes y definir cuál técnica es más conveniente de acuerdo al tipo, características y estado de desarrollo germinal o embrionario que se vaya a criopreservar.

Se pretende por tanto, recopilar cuáles son los resultados obtenidos en las diferentes investigaciones realizadas para la criopreservación de oocitos y embriones bovinos y equinos comparando la técnica tradicional de congelación lenta con la vitrificación

Objetivos

Objetivo general

Identificar los beneficios que ofrece la técnica de vitrificación de ovocitos y embriones en equinos y bovinos, comparada con otras técnicas de criopreservación.

Objetivos específicos

- Analizar los principales protocolos existentes en la actualidad para la técnica de vitrificación de ovocitos y embriones en bovinos y equinos.
- Evaluar las consecuencias en torno al ambiente celular en embriones y ovocitos de equinos y bovinos, que se generan después del procedimiento de vitrificación comparada con otras técnicas de criopreservación..

Marco teórico

Criopreservación

La criopreservación es el uso de temperaturas ultra bajas -133°C a -196°C (Ávila-portillo et al., 2006) para conservar células y tejidos vivos estructuralmente intactos y mantener el metabolismo celular quiescente durante el almacenamiento, mediante la utilización de crioprotectores, permitiendo la sobrevivencia de los especímenes y su funcionalidad (Leibo, 2008). La criopreservación de células y tejidos vivos se encuentra en dos categorías básicas, la congelación lenta y la vitrificación.

La congelación lenta utiliza concentraciones bajas de crioprotectores (Phillips y Jahnke, 2016) de 1.0 - 1.5 M para oocitos y 1.35 - 1.5 M para embriones (Saragusty y Arav, 2011) y temperaturas generalmente entre -80 y -196°C (Izquierdo et al., 2015). Los crioprotectores comúnmente utilizados son el glicerol y el etilenglicol, el cual es considerado el crioprotector ideal porque tiene una alta penetración y baja toxicidad (Martins et al., 2005; Pegg, 2015). Este procedimiento, con o sin el uso de azúcares tales como sacarosa o arabinogalactano, funcionan generando presión osmótica extracelular ayudando al intercambio lento de agua intracelular por el crioprotector adicionado al medio, permitiendo menor formación de cristales de hielo durante la congelación de las células (Phillips y Jahnke, 2016), puesto que estos cristales perforan la membrana celular o separan las células provocando destrucción mecánica. (Vajta, 2000)

Como ventaja de la congelación lenta está su confiabilidad probada para criopreservar tanto embriones bovinos producidos in vivo como embriones equinos menores de 300μ .

Las principales desventajas con enfriamiento lento son el tiempo que tarda en congelar un embrión (aproximadamente 2 horas) y la necesidad de un costoso congelador celular programable. (Squires, 2016)

La vitrificación, es la solidificación de una solución utilizando altas concentraciones de crioprotectores (Azari, Kafi, Ebrahimi, Fatehi y Jamalzadeh, 2016) y una disminución muy rápida de la temperatura a -196°C (Phillips y Jahnke, 2016). Es considerada una técnica de congelación ultrarrápida que previene la formación de cristales de hielo (Squires, 2016), preservando así la arquitectura intracelular y de las membranas. Los métodos de vitrificación emplean volúmenes mínimos de solución de vitrificación y contacto directo con nitrógeno líquido, con el fin de aumentar las tasas de enfriamiento y calentamiento que son factores críticos para una vitrificación exitosa, lo que permite reducir las concentraciones de crioprotectores. (Rusciano et al., 2017)

Los crioprotectores más usados para este procedimiento incluyen el dimetil sulfoxido (DMSO), el polietilenglicol y el glicerol (Phillips y Jahnke, 2016). El éxito de la vitrificación depende de tres factores claves: la velocidad de enfriamiento, la alta concentración de los crioprotectores añadidos a la solución de vitrificación (VS) comparado con las concentraciones que se usan en la congelación lenta (CL) y el volumen de la muestra. (Xueli et al., 2015)

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. (Izaguirre, 2012; Kim et al., 2012)

Existen varios métodos comerciales de vitrificación, entre ellas el Cryotec, Open Pulled Straw OPS, CPS (Closed pulled straw), CryoTip®, superficie sólida, cryoloop, Hemi-paja, (Gutnisky, Alvarez, Cetica y Dalvit, 2013; Vajta et al., 1998; Vermilyea y Brewer, 2017; Kamath y Muthukumar, 2017). Minimun drop size (MDS), electron microscoped grids (EM), gel loding tips, nylon mesh, flexipet denuding pippete (FDP), superfinelly open pulled Straw (SOPS), cryoleaf, cryotop, sealed pulled Straw, plastic blade, cryopette, cryologicvitrification method (CVM). (Villamil, Lozano, Oviedo, Ongaratto y Bó, 2012)

Crioprotectores

Los crioprotectores son moléculas que se emplean en la criopreservación para evitar las lesiones por el enfriamiento de las células. La eficacia de los crioprotectores en general depende de su solubilidad en agua y su capacidad de permanecer soluble a bajas temperaturas, su capacidad de penetración de las membranas y compartimientos celulares, la baja toxicidad para poder ser utilizado a las altas concentraciones requeridas (Pegg, 2015), según su permeabilidad se clasifican en dos tipos: en permeables y no permeables: (Izaguirre, 2012)

Los permeables son:

Es el caso del etilenglicol (EG) el propilenglicol y el dimetilsulfoxido (DMSO). Realizan su función entrando a la célula reemplazando el agua intracelular, modificando sus características fisicoquímicas y su respuesta ante el descenso de a temperatura a través de la disminución del punto de congelación de la suspensión impidiendo la formación de hielo. (Izquierdo et al., 2015; Izaguirre, 2012)

Los no permeables se encargan de reducir el agua intracelular por efecto osmótico. Cuando la célula entra en contacto con una solución de crioprotectores no permeables, comúnmente utilizados en la criopreservación, la célula se deshidrata para contrarrestar la diferencia de presión osmótica (Izaguirre, 2012). Los crioprotectores no permeables a su vez se clasifican en crioprotectores de bajo y alto peso molecular. Los de bajo peso molecular son: mono y disacáridos como la sucrosa (el más empleado actualmente) trehalosa, glucosa y galactosa y los de alto peso molecular son: polímeros como el polivinilalcohol, polietilenglicol, ficoll y polivinil pirrolidona. (Izquierdo et al., 2015)

Por otro lado, para disminuir los efectos tóxicos de las soluciones de vitrificación se emplean varias estrategias (Vajta y Nagy, 2006), entre ellas el empleo de crioprotectores de baja toxicidad y alta permeabilidad. (Vajta y Nagy, 2006; Sanchez et al., 2017; Izaguirre, 2012)

La adición de crioprotectores por pasos, en soluciones de concentración ascendente. Los métodos recientes, además, se centran en buscar el menor tiempo de exposición posible a los crioprotectores dependiendo del tipo de muestra (Izaguirre, 2012). La disminución de la temperatura durante la exposición del embrión a la solución final de vitrificación (concentración más elevada de crioprotectores). Este procedimiento podría ser útil pero existe el riesgo, aún no comprobado, de que se produzcan lesiones por frío. (Pegg, 2015; Izaguirre, 2012)

En resumen el proceso de vitrificación consiste en (Vanderzwalmen et al., 2015; Izaguirre, 2012):

- Exposición de material a criopreservar (oocitos embriones) a soluciones de vitrificación con concentraciones ascendentes de crioprotectores, disueltos en un buffer en presencia o no de crioprotectores no permeables. La última solución, con la concentración de crioprotector más elevada podrá oscilar entre 5-7M. (Vajta, Reichart, Filippo y Rienzi, 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 et al., 2015)

El uso de concentraciones muy altas de crioprotectores puede ser un fuerte argumento contra el uso creciente de la técnica vitrificación. Las concentraciones totales requeridas para obtener un estado vítreo están usualmente entre 6 y 8 molar y están muy cerca de los límites tolerables para las células. Como consecuencia el temor a exponer los gametos y los embriones a grandes cantidades de soluciones de crioprotector que exceden de tres a cuatro veces de los aplicados en la congelación lenta (CL) ha sido la parte central de un debate iniciado por los defensores de esta última.

Vanderzwalmen et al. (2015) encontraron que solo un pequeño porcentaje del crioprotector presente en las soluciones de vitrificación entra a través de la membrana celular.

En este mismo estudio probaron que la concentración intracelular de crioprotectores en cigotos de ratón durante el procedimiento de vitrificación antes de sumergirlos en el nitrógeno líquido es aproximadamente igual a 2,14 M, tres veces por debajo de la concentración en la solución de vitrificación que rodea la célula.

Además, contrariamente a lo que se creía comúnmente, se ha observado que la concentración intracelular de crioprotector en los cigotos vitrificados es incluso menor que en la técnica de congelación lenta, a pesar de trabajar con mayores cantidades de crioprotector en las soluciones. (Vanderzwalmen et al., 2015)

Criopreservación de oocitos

La criopreservación de los oocitos se ha vuelto cada vez más importante y el almacenamiento de oocitos no fertilizados tiene numerosas aplicaciones. Una de estas aplicaciones es la preservación de líneas genéticas importantes (Mara, Casub, Carta y Dattena, 2013), mayor capacidad de recuperación de hatos después de brotes de enfermedades económicamente importantes, con alta mortalidad, preservación de la línea materna de especies en peligro de extinción, reducción del costo y tiempo en la cría tradicional. (Keros y Fuller, 2015)

Los primeros mamíferos nacidos vivos de oocitos criopreservados se reportaron en ratones (Whittingham, 1997). Gran parte de la criobiología de los oocitos mamíferos fundamenta su investigación en el modelo murino, desde entonces se han reportado

preñeces y nacidos vivos resultantes de oocitos criopreservados en varias especies incluyendo: conejos (Al Hasani et al. 1989), vacas (Fuku, Kojima, Shoiya, Marcus y Downey, 1992), caballos (Maclellan et al., 2002), felinos (Pope et al., 2012) y humanos (Chen, 1986). Sin embargo, en la mayoría de las especies las tasas de éxito de oocitos criopreservados que llegan a ser preñeces y posteriores nacimientos son mucho más bajos que la de los embriones criopreservados (Keros y Fuller, 2015). Se han reportado tasa de preñez de 31.5% para embriones bovinos criopreservados producidos in vitro (Aller, Albeiro y Palma, 2000) en equinos se obtuvo el 26% de preñez de embriones obtenidos por ICSI. (Maclellan, Stokes, Preis y Carnevale, 2010)

Las bajas tasas de preñez obtenidas de embriones producidos con oocitos vitrificados es debida a características morfológicas y funcionales únicas del oocito, como lo son su tamaño, el volumen de agua intracitoplasmática, la distribución de los organelos, la organización del citoesqueleto y la organización de la cromatina. (Azari et al., 2016; Sprícigo et al., 2014)

Un estudio donde se observaron las tasas de escisión y desarrollo de blastocistos de cigotos en estadios pronucleares, lo cual los hace similares en estructura a los oocitos, mostro que la técnica de vitrificación tiene mejores tasas en comparación con la congelación lenta (54%-22% vs 8,6%- 4.9% respectivamente). (Vanhuong, Walton, Catt y Robinson, 2017)

El oocito es una célula de gran tamaño con respecto a las células somáticas, 120 micras en comparación con 20 micras (RED) con baja permeabilidad al agua que varía según la especie, raza y estado de maduración del oocito, que requiere variaciones en los agentes crioprotectores que se usan y sus concentraciones (Ochoa, 2011). Los

oocitos tienen una tendencia a retener el agua a medida que el hielo empieza a formarse en el medio de suspensión durante el enfriamiento, esto conduce a la formación de hielo intracelular y a medida que el enfriamiento continúa, provoca daños en la célula. (Keros y Fuller, 2015)

El oocito maduro es una célula de vida corta y debe ser fertilizada para que pueda seguir el proceso de desarrollo. Para que dicho proceso ocurra normalmente el oocito debe conservar la integridad de la zona prelucida, los gránulos corticales y el huso micro tubular en el que se organizan los cromosomas (Keros y Fuller, 2015). La zona pelúcida es un revestimiento de mucopolisacaridos que rodea al oocito. (García et al., 1995)

Los cambios en ella iniciados por la acción de un único espermatozoide que se une a su receptor, inducen a los gránulos corticales a liberar su contenido, las enzimas liberadas de dichos gránulos provocan la reticulación de las glicoproteínas de la zona pelúcida, haciéndola impenetrable para otros espermatozoides (Cheeseman, Boulanger, Bond y Schuh, 2016). Se ha demostrado que la criopreservación provoca la liberación prematura de las enzimas de los gránulos corticales induciendo el bloqueo en la penetración del espermatozoide. Los agentes crioprotectores pueden causar un aumento del calcio intracelular similar al causado por la entrada de espermatozoides y posterior inducción de endurecimiento de la zona pelúcida (Rader, Choi y Hinrichs, 2016). Por otro lado, la criopreservación puede conducir a un daño físico de la zona pelúcida lo que podría resultar en la entrada de múltiples espermatozoides impidiendo el desarrollo normal del embrión (Rader et al., 2016). Aunque ambas situaciones podrían superarse mediante la aplicación de la técnica de inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) procedimiento mediante el cual, se sobrepasa la barrera de la zona pelúcida

inyectando directamente un solo espermatozoide en el ooplasma y así lograr la fertilización (Rader et al., 2016). En los oocitos maduros los cromosomas condensados están alineados sobre el huso microtubular, y dicha estructura es la responsable de los movimientos de los cromosomas durante la división celular (Keros y Fuller, 2015), además la crioconservación puede causar daño del ADN disminuyendo el nivel de ARN mensajero (ARNm; Keros y Fuller, 2015). En un estudio se mostró que la vitrificación de oocitos no afecta las tasas de escisión de cigotos (67,0% vs. 73,8% de control), pero si reduce la tasa de Blastocistos (9,6% frente a 23,0%), además en este trabajo observaron que los niveles de metilación del ADN en los oocitos y embriones de escisión temprana fue menor para los oocitos vitrificados (Chen et al., 2016). Se ha observado que los oocitos inmaduros son más sensibles al estrés anisotónico, con una menor estabilidad de la membrana celular que los oocitos en metafase II (Leon et al., 2012; Xueli et al., 2015), aunque parece ser que las células del cumulo protegen al oocito de los daños de la criopreservación, En equinos se observó que los oocitos en metafase II con células del cúmulo conservan mejor la calidad del huso meiótico durante la vitrificación que los oocitos desnudos (38,1% vs 3,1% respectivamente). (Tharasanit, Colleoni, Galli, Colembrander y Stout, 2009)

El daño en el huso, puede conducir a la aneuploidia después de la fertilización. Para evitar su el potencial daño del huso durante la criopreservación es preferible vitrificar oocitos en estado inmaduros cuando aún no ha ocurrido la formación de dicha estructura. Aunque el principal problema de la criopreservación de oocitos inmaduro es que deben ser madurados in vitro para poder ser fertilizables (Keros y Fuller, 2015); esta maduración involucra la comunicación del oocito con las células del cúmulo que es un

proceso vital para el correcto desarrollo de un oocito competente (Hussein, Thompson y Gilchrist, 2006), Las células del cúmulo son más pequeñas que el oocito y están interconectadas a él por medio de uniones gap (García et al., 1995). Lograr la supervivencia de oocitos, células del cumulo y las conexiones entre los dos, durante la crioconservación ha sido desafiante para la ciencia, sin embargo, se ha demostrado que la preservación de esta conexión celular puede lograrse cuando se aplica el método de vitrificación. (Keros et al., 2009; Xueli et al., 2015)

Los oocitos inmaduros en la etapa de vesícula germinal (GV) tienen menor permeabilidad y estabilidad a la membrana que los madurados, lo que los hace menos tolerantes a la criopreservación, La vitrificación de oocitos bovinos inmaduros usando helio líquido (LHe) dio como resultado tasas más altas de morfología normal y competencia de desarrollo post-descongelación que el uso de nitrógeno líquido (LN2) Los resultados indicaron que las tasas de morfología normal, maduración, escisión y blastocistos en el grupo vitrificado de LHe (89,3%, 52,8%, 42,7% y 10,1%,) fueron todas superiores a las obtenidas en el grupo vitrificado con LN2 (79,3%, 43,4%, 34,1 % Y 4,7%) respectivamente. (Xueli et al., 2015)

Actualmente la criopreservación de oocitos equinos y bovinos sigue siendo un desafío debido a su sensibilidad al estrés oxidativo, probablemente como consecuencia del contenido sustancial de lípidos en las mitocondrias y el retículo endoplásmico liso. Además, aunque no están bien caracterizados, los oocitos equinos tienen aparentemente una pobre permeabilidad a los crioprotectores (Leon et al., 2012). Asimismo, altas concentraciones de crioprotectores son tóxicas para las células, sin embargo, el impacto de la toxicidad se ha logrado reducir a través del uso de bloqueadores de formación de

hielo sintéticos adicionados a las soluciones de vitrificación. En un trabajo en equinos se usó el bloqueador supercool X-1000 (21st Century Medicine Inc.) y se logró obtener mayores tasas de maduración y mejor integridad de membrana con los oocitos tratados con el bloqueador 30% y 46% que con los no tratados 13% y 31% (Leon et al., 2012). Los bloqueadores de hielo sintéticos mejoraron la tasa de supervivencia de los oocitos debido a su capacidad para unirse a la membrana celular e impedir la formación de cristales de hielo. (Leon et al., 2012)

Por otro lado, una alternativa para mejorar la supervivencia de oocitos después de la vitrificación es la selección de oocitos competentes para la crioconservación por medio de la evaluación morfológica. El azul brillante de cresilo (BCB) es una técnica de tinción supravital que se ha utilizado para identificar con éxito los oocitos más competentes en bovinos (Silva, Rodriguez, Galuppo y Arruda, 2013) y equinos (Pereira et al., 2014). La técnica BCB estima la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), una enzima que se sintetiza en los oocitos en crecimiento, pero se disminuye su actividad cuando los oocitos han terminado su fase de crecimiento. (Villamil, Ongaratto, Moreira, Taranco y Bó, 2016)

Los oocitos expuestos al BCB muestran una coloración azul cuando el citoplasma tiene bajos niveles de G6DPH, esta tinción es una herramienta que puede mejorar la evaluación visual de los oocitos y proporciona una mejor escogencia de los grupos de oocitos competentes para ser vitrificados (Hajarian et al., 2010). En un estudio se encontró que los oocitos vitrificados expuestos al BCB alcanzaron estadio MII más rápido que otros grupos vitrificados (51,5% - 40,3%). Estos resultados indican que la selección

de oocitos inmaduros usando BCB podría mejorarla madurez nuclear después de la vitrificación. (Hajarian et al., 2010)

En comparación la supervivencia de oocitos después de la vitrificación muestra mejores resultados para bovinos en comparación con los equinos. Cuando se compararon las tasas de supervivencia para oocitos equinos y bovinos se encontró que usando el método OPS los oocitos equinos solo tenían una supervivencia del 30% mientras que con los oocitos bovinos se logró una tasa del 90%. (Leon et al., 2012)

Criopreservación de embriones

La criopreservación junto a la transferencia de embriones e inseminación artificial, en bovinos y equinos es una técnica que contribuye al incremento de la productividad animal, ya que permite la preservación y transporte de gametos accediendo el incremento del número de crías por hembra a lo largo de su vida reproductiva.

En varios estudios no se han encontrado diferencias entre las técnicas de congelación lenta y vitrificación para la criopreservación de embriones equinos menores de 300 μm ; con resultados que varían entre el 50 y 70% de preñez. (Squires, 2016; Martins et al., 2005; Diaz et al., 2015; Sanchez et al., 2017)

A medida que el tamaño del embrión aumenta más allá de las 300 μm , la supervivencia del mismo después de la criopreservación se hace menos viable obteniendo diferentes resultados bastante desalentadores para ambas técnicas (Squires, 2016; Diaz et al., 2015; Hendriks, Roelen, Colenbrander y Stout, 2015), entre las causas que se le adjudican al bajo resultado de la criopreservación de embriones equinos

mayores a 300 μm , se encuentran el mayor tamaño y volumen del blastocele (Diaz et al., 2015; Squires, 2016; Sanchez et al., 2017), la intensa actividad mitótica y por tanto el rápido aumento celular (Diaz et al., 2015; Squires, 2016; Sanchez et al., 2017) y la presencia de la cápsula de glicoproteína embrionaria. (Diaz et al., 2015; Squires, 2016; Sanchez et al., 2017)

La cápsula embrionaria se desarrolla al día 6.5 poco después de que el embrión entra en el útero, coincidiendo con el inicio de la blastulación (Diaz et al., 2015), por tal razón para obtener embriones sin que se haya formado la capsula deben recuperarse al rededor del día 6 o 6.5 post ovulación, estando en fase de mórula o blastocisto temprano, lo cual dificulta la búsqueda y disminuye la tasa de recuperación. (Diaz et al., 2015; Squires, 2016; Sanchez et al., 2017)

Aunque las funciones de la cápsula no han sido completamente dilucidadas se sabe que es esencial para la viabilidad embrionaria (Diaz et al., 2015); pero parece ser que la baja permeabilidad de dicha cápsula es el principal obstáculo para el éxito de la criopreservación (Diaz et al., 2015). Es así como la punción de la cápsula se presenta como una alternativa factible para la crioconservación de embriones con presencia de la capsula.

Para los embriones, similar a lo encontrado para oocitos, el método de vitrificación ha demostrado evitar la formación de cristales de hielo durante la crioconservación, pero la alta concentración de crioprotectores necesaria para llevar a cabo dicha técnica puede causar daño celular (Hendriks et al., 2015); Determinar diferencias en la viabilidad embrionaria entre la técnica de congelación lenta y la vitrificación es difícil ya que la prueba de éxito, que es la preñez, es un parámetro de todo o nada; por lo tanto se

requiere un número alto de transferencias para probar definitivamente con cual técnica se obtiene mejor efectividad. (Hendriks et al., 2015)

A esto se le suma que la evaluación estéreomicroscópica de la morfología embrionaria realizada antes de la transferencia de embriones es un indicador subjetivo de la viabilidad del embrión. (Hendriks et al., 2015)

En un estudio desarrollado por Hendricks et al. (2015) se evaluó la cantidad y tipo de daños causados por la congelación lenta y la vitrificación en la integridad celular y la actividad mitocondrial (indicativo de la capacidad metabólica) en embriones equinos menores y mayores de 300 μ m. Ambas técnicas de criopreservación mostraron altas tasas de daño en embriones mayores de 300 μ m, sin diferencias significativas entre ellas (53.3% +/- 27% y 26.3% +/-18.5% para la vitrificación y CL respectivamente).

Similarmente Tharasanit et al. (2009) encontraron que 19.9% de células dañadas después de la CL para embriones mayores de 300 μ m. Aunque no encontraron diferencias en la proporción de embriones que se desintegraron entre la CL (6/15, 40%) y la vitrificación (2/14, 14%).

Por otro lado, la exposición de los embriones mayores de 300 μ m a crioprotectores de vitrificación resultó en tasas más altas de muerte celular que la exposición a la crioprotectores para congelación lenta (6.8% vs 0.3%).

Continuando con el estudio de Hendricks et al. (2015) se encontró que para embriones menores de 300 μ m, tampoco hubo diferencias significativas para ambas técnicas (3.3% para la congelación lenta vs 19.9% para la vitrificación); Resultado comparable con lo descritos por Moussa et al. (2005; 42% congelación lenta y 46% para

la vitrificación) y Oberstein et al. (2001; 26% congelación lenta y 49% Vitrificación) al igual que Sanchez et al. (2017; 55.7% Vitrificación 75% Congelación Lenta).

Ante este panorama de resultados negativos de crioconservación de embriones mayores de 300 μ m, se ha venido desarrollando una alternativa que consiste en el colapso de la cavidad del blastocele antes de la vitrificación. (Diaz et al., 2015; Squires, 2016; Sanchez et al., 2017)

Choi et al. (2011) lograron tasas de preñez del 71% para embriones mayores de 300 μ m, después de punción del blastocisto y aspiración del líquido del blastocele. (Diaz et al., 2015; Sanchez et al., 2017)

Diaz et al. (2015) Reportaron tasas de preñez del 83.3% y el nacimiento de potros sanos después de la transferencia de 6 embriones equinos de día 8 mayores de 300 μ m, colapsados, vitrificados y calentados. (Sanchez et al., 2017)

Recientemente Ferris, McCue, Trundell, Morrissey y Barfield (2016) informaron sobre un método para colapsar manualmente embriones mayores de 300 μ m, antes de la vitrificación. Compararon la técnica estándar con micromanipulador vs la técnica manual utilizando una aguja calibre 25 para perforar la cápsula y retirar el fluido del blastocele; obtuvieron 11 de 15 preñeces mediante el método del micromanipulador y 7 de 15 preñeces para la técnica Manual. (Squires, 2016)

Sanchez et al. (2017) obtuvieron tasas de preñez del 70% de embriones mayores de 300 μ m, colapsados y vitrificados en hemipajuelas.

Estos resultados evidencian que la técnica de aspiración del blastocele se presenta como una alternativa eficiente para la vitrificación de embriones equinos

mayores de 300µm, resultados alentadores para desarrollar futuras investigaciones y perfeccionar dicha técnica.

Las tasas de supervivencia de embriones bovinos después de ser vitrificados y temperados han sido bajas, con tasas de producción de embriones entre 0 a 13%. (Zhou, Naib, Sun y Lonergan, 2010; Morató, Izquierdo, Paramio y Mogas, 2008)

En embriones bovinos producidos in vivo no se ha encontrado diferencias significativas entre la técnica de congelación lenta y la vitrificación, en el estudio de Villamil et al. (2012) el porcentaje de reexpansión de los embriones in vivo criopreservados por congelación lenta fue del 86% mientras que para la vitrificación fue del 93% y el porcentaje de eclosión fue del 81% y 78% respectivamente (tabla 1). Xueli et al. (2010) reportaron un porcentaje de supervivencia de embriones in vivo a las 24 y 72 horas de 52,3% para congelación lenta vs 63.4% para la vitrificación y de 27.5% para la congelación lenta vs 38% para la vitrificación respectivamente (tabla 3).

Los embriones bovinos en etapa de blastocisto tienen una mayor relación nuclear citoplasmática que los hace más adecuados para la criopreservación porque ya han superado el bloqueo embrionario y una primera selección ya se ha hecho (Asgari, Hosseini, Forouzanfar y Hajian, 2012). Los blastocitos bovinos derivados de la fertilización in vitro (FIV) de desarrollo más rápido (cosechados 7 días después de la inseminación) toleran mejor la criopreservación que los de desarrollo lento (cosechados 8 días después de la inseminación). (Hamawaki, Kuwayama y Hamano, 2010)

Las tasas de desarrollo embrionario son menores para los embriones in vitro comparado con los in vivo debido a sus diferencias morfológicas, metabólicas y genómicas. Los embriones producidos in vitro durante la criopreservación sufren mayor

estrés osmótico gracias al mayor número de lípidos en la membrana celular y a la menor flexibilidad, lo que los hace menos tolerantes a las bajas temperaturas. Los lípidos son una fuente importante de energía durante la maduración de oocitos, la fertilización y la escisión temprana del embrión. Los triglicéridos son la principal clase de lípidos sintetizados en los oocitos y los embriones bovinos. Blastocistos bovinos producidos in vitro tienen citoplasma más oscuro como consecuencia de una mayor acumulación de lípidos que embriones derivados in vivo; Esto se asocia con deterioro de la calidad del embrión, y la reducción de la criotolerancia. (Barceló y Seidel, 2011)

Es por esto que hay mayores tasas de supervivencia en embriones producidos in vitro cuando se usa el método de vitrificación comparado con la congelación lenta (59 % - 20 % respectivamente; Villamil et al., 2012; 60% - 31%; Tabla 1; Nedambale et al., 2004; 93% - 73%; Tabla 4; Vanhuong et al., 2017; 35% - 24%; Xueli et al., 2010; Tabla 2).

Tabla 1

Sistema de producción de embriones	Sistema de criopreservación	Embriones #	Re - expansión n (%)	Eclosión n (%)
In vivo	Congelación lenta	100	86 (86)	81 (81)
	Vitrificación	110	93 (85)	78 (71)
In vitro	Congelación lenta	222	89 (40)	45 (20)
	Vitrificación	223	155 (69)	132 (59)

Fuente: Villamil et al., 2012

Tabla 2

Método criopreservación	# de embriones	Morfología Normal/descongelados %	Supervivencia embriones %	
			24 h	72 h
Congelación lenta	155	75.8 ± 6.1	46.9 ± 3.7	24.7 ± 5.4
OPS	153	87.9 ± 5.2	58.0 ± 6.8	35.2 ± 6.0
CPS	158	85.4 ± 4.9	56.3 ± 4.4	34.9 ± 6.7

Fuente: Xueli et al., 2010

Tabla 3

Método criopreservación	# de embriones	Morfología Normal/descongelados %	Supervivencia embriones %	
			24 h	72 h
Congelación lenta	63	87.7 ± 7.1	52.3 ± 2.6	27.5 ± 5.7
OPS	68	88.6 ± 7.1	63.4 ± 7.7	38.7 ± 5.4
CPS	67	86.3 ± 5.5	63.4 ± 8.6	37.2 ± 3.8

Fuente: Xueli et al., 2010

Tabla 4

Protocolo	Blastocistos descongelados N	Blastocitos re expandidos a las 24h N/%	Tasas de eclosión a las 48h blastocistos descongelados N/%	Tasa de eclosión a las 48h blastocistos expandidos N/%
Control	51	51	50 (98)	50 (98)
Congelación lenta	47	42	31 (66)	31 (73)
Vitrificación equilibramiento corto	51	49	46 (90)	46 (93)
Vitrificación equilibramiento largo	50	48	42 (84)	42 (87)

Fuente: Vanhuong et al., 2017

Metodología

Se pretende en este trabajo realizar una revisión de las publicaciones más recientes que permitirán dilucidar cuál de los métodos de criopreservación es el más efectivo para congelación de embriones y oocitos bovinos y equinos, teniendo en cuenta las ventajas y desventajas operativas, menor daño celular, mayor tasa de supervivencia, blastocistos o preñez y cual presenta la mejor relación costo beneficio para el profesional.

Para tal fin se realizará una recopilación de textos y artículos científicos relacionados con el tema, que permitan identificar de cada metodología sus ventajas y viabilidad en el ejercicio profesional; Se realizarán entrevistas a profesionales que tengan conocimiento en la vitrificación y práctica en dicho procedimiento para así profundizar más en el tema y así realizar un aporte desde la parte teórico-práctico.

Uno de los profesionales que aportaran a la investigación es la Dra. Isabel Catalina Vélez Medica Veterinaria Zootecnista, con Maestría, especialista en Reproducción Animal avalada por el Colegio Americano de Teriogenología y en proceso de Doctorado y con amplia experiencia internacional en el tema de vitrificación de embriones y oocitos, certificado con un número interesante de publicaciones científicas al respecto.

Conclusiones

La técnica de vitrificación ha demostrado tener resultados similares a la técnica de congelación lenta, superando a esta última en la criopreservación de oocitos, embriones bovinos producidos in vitro y embriones equinos con capsula después del colapso del blastocele.

La técnica de vitrificación tiene un potencial de crecimiento y mejoramiento tratando de aumentar las tasas de enfriamiento y calentamiento ultrarrápidas mediante la disminución del volumen de la solución de vitrificación y el tipo de empaque de almacenamiento.

Un resultado confiable en la vitrificación de embriones bovinos y equinos tiene un gran potencial comercial ya que facilitaría el manejo de receptoras al no requerir sincronización, igualmente facilitando el transporte internacional.

Perspectivas

El éxito moderno de la vitrificación como método de criopreservación de los sistemas vivos en general, y de las células y tejidos relacionados con las funciones reproductivas en particular, es el resultado de un proceso de décadas de mejora gradual de la comprensión de los requerimientos físicos y biológicos de la criopreservación. A pesar de muchos malentendidos básicos, falsos comienzos y fallos a lo largo del camino, la viabilidad intrínseca de la criopreservación por vitrificación es ahora clara y las aplicaciones continúan creciendo de forma explosiva tres décadas después de que se lanzara la primera ola moderna de entusiasmo por la vitalización. Sigue estableciéndose una variedad de nuevos métodos para evitar las lesiones, aumentar la seguridad y mejorar la facilidad de uso, y esto puede esperarse que continúe. Un nuevo desarrollo esperanzador para un impulso más amplio para el campo está empezando a surgir en forma de nuevos exámenes de los efectos biológicos, moleculares de las soluciones de vitrificación y de las lesiones por frío, una empresa que probablemente traerá consigo nuevas soluciones para los viejos problemas y la capacidad de abordar nuevos problemas que estaban previamente fuera de alcance. (Fahy, 2015)

El número de transferencias de embriones equinos ha aumentado dramáticamente para los embriones frescos y enfriados, el número de embriones congelados no ha aumentado proporcionalmente. En el ganado bovino, casi el 60% de los embriones recuperados están congelados, se estima que este porcentaje en el caballo es solo 2% a 5% de los embriones recolectados; los embriones congelados

podrían disminuir el costo de mantener las receptoras y proporcionar una mayor flexibilidad. Antes de que un aumento en el número de embriones de equinos congelados se presente, varios desarrollos tendrán que ocurrir (Squires, 2016) :

1. Ser capaz de superovular consistentemente yeguas para que los embriones adicionales estén disponibles para la criopreservación.
2. Desarrollar un medio de acelerar el embrión a través del oviducto para que los pequeños embriones se puedan obtener de forma consistente o mejorar el sistema de deflación manual de los grandes embriones antes de la vitrificación.
3. Desarrollar nuevos mercados internacionales para embriones equinos congelados/descongelados.

En embriones equinos mayores a 300μ la técnica de puntuación y evacuación del blastocelo antes de la vitrificación ha demostrado resultados esperanzadores lo que indica el camino a seguir en el desarrollo de futuras investigaciones.

El mejoramiento de la técnica de vitrificación va a estar determinado por el desarrollo de procedimientos que permitan la disminución del volumen de la solución de vitrificación y los tipos de almacenamiento que permitan seguir incrementando el descenso ultrarrápido de la temperatura durante la criopreservación.

Más investigaciones futuras en vitrificación de oocitos y embriones bovinos y equinos deben tener como resultado final la preñez e incluso el nacimiento de crías vivas para determinar su verdadero potencial comercial.

Referencias

Al Hasani, S., Kirsch, J., Diedrich, K., Blanke, S., Van der Ven, H., Krebs, D. (1989). Successful embryo transfer of cryopreserved and in vitro fertilized rabbit oocytes. *Human Reproduction*, 4, (1), 77 - 79. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2708506>

Aller, J., Alberio, R., Palma, G. (2000). Gestación con embriones producidos in vitro a partir de ovocitos recuperados de vacas ovariectomizadas. *Archivos de medicina veterinaria*, 32, (1), 33 - 39. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2000000100004

Asgari, V., Hosseini, S., Forouzanfar, M., Hajian, M. (2012). Vitrification of in vitro produced bovine embryos: Effect of embryonic block and developmental kinetics. *Criobiology*, 65, (3), 278 - 283. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224012002210>

Ávilla-portillo, L.M., Madero, J., López, C., León, M.F., Acosta, L., Gómez, C., et al. (2006). Fundamenton de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 57, (4), 291 - 300. Recuperado de <https://revista.fecolsog.org/index.php/rcog/article/view/468/513>

Azari, M., Kafi, M., Ebrahimi, B., Fatehi, R., Jamalzadeh, M. (2016). Oocyte maturation, embryo development and gene expression following two different methods of bovine cumulus-oocyte complexes vitrification. *Veterinary Research Communication*, 41, (1), 49 - 56. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/311566682_Oocyte_maturation_embryo_deve

[lopment and gene expression following two different methods of bovine cumulus-oocyte complexes vitrification](#)

Barceló, M., Seidel, G. (2011). Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine oocytes and blastocysts. *Theriogenology*, 75, (3), 434 - 444. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X1000467X>

Campos, L., Suh, T., Barcelo, M., Seidel, G., Carnevale, E. (2009). Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. *Theriogenology*, 71, (2), 349 - 354. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18789516>

Cao, Y., Xing, Q., Li, L., Cong, L., Zhang, G., Wei, L., et al. (2009). Comparison of survival and embryonic development in human oocytes cryopreserved by slow-freezing and vitrification. *Fertility and Sterility*, 92, (4), 1306 - 1311. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18930218>

Cheeseman, L., Boulanger, J., Bond, L., Schuh, M. (2016). *Two pathways regulate cortical granule translocation to prevent polyspermy in mouse oocytes*. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/ncomms13726>

Chen, Christopher. (1986). Pregnancy after human oocytes cryopreservation. *The Lancet*, 327, (8486), 884 - 886. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067368690989X>

Chen, H., Zhang, L., Deng, T., Zou, P., Wang, Y., Quan, F., et al. (2016). Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. *Theriogenology*, 86, (3), 868 - 878. Recuperado de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(16\)00125-4/pdf](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(16)00125-4/pdf)

Choi, Y., Velez, I., Riera, F., Roldán, J., Hartman, D., Bliss, S. et al. (2011). Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology*, 76, (1), 143 - 152. Recuperado de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(11\)00065-3/fulltext](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(11)00065-3/fulltext)

Cobo, A., Diaz, C. (2012). Clinical application of oocytes vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and sterility*, 96, (2), 277 - 285. Recuperado de [http://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(11\)00975-7/fulltext](http://www.fertstert.org/article/S0015-0282(11)00975-7/fulltext)

Diaz, F., Bondiolli, K., Paccamonti, D., Gentry, G. (2015). Cryopreservation of day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification. *Theriogenology*, 85, (5), 894 - 903. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26639642>

Edgar, D., Gook, D. (2012). A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 18., 5, 536 - 554. Recuperado de <https://academic.oup.com/humupd/article/18/5/536/598648?searchresult=1>

Fadini, R., Brambillasca, F., Mignini, R., Merola, M., Comi, R., Ponti, E., et al. (2009). Human oocyte cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods. *Reproductive Biomedicine Online*, 19, (2), 171 - 180. Recuperado de [http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)60069-7/fulltext](http://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)60069-7/fulltext)

Fahy, Gregory. (2015). Overview of biological vitrification. En Tucker y Liebermann, *Vitrification in assisted reproduction second edition* (1 - 22). Boca Raton: CRC Press.

Ferris, R., McCue, P., Trundell, D., Morrissey, J., Barfield, J. (2016). Vitrification of large equine embryos following manual or micromanipulator-assisted blastocoele

collapse. *Journal of equine veterinary science*, 41, 64 - 65. Recuperado de [http://www.j-
evs.com/article/S0737-0806\(16\)30171-X/abstract](http://www.j-
evs.com/article/S0737-0806(16)30171-X/abstract)

Fuku, E., Kojima, T., Shioya, Y., Marcus, G., Downey, B. (1992). In vitro fertilization and development of frozen - thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, 29, (4), 484 - 492. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0011224092900513>

García, A., Castejón, F., Palomino, L., González, J., Murillo, M., Salido, G. (1995). *Fisiología Veterinaria*. Madrid: McGraw Hill Interamericana.

Gutnisky, C., Alvarez, G., Cetica, P., Dalvit, G. (2013). Evaluation of the Cryotech Vitrification Kit for bovine embryos. *Cryobiology*, 67, (3), 391 - 393. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224013002022>

Hajarian, H., Wahid, H., Rosnina, Y., Daliri, M., Dashtizad, M., Karamishabankareh, M., et al. (2010). Selection of immature bovine oocytes using brilliant cresyl blue enhances nuclear maturity after vitrification. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9, (21), 2710 - 2713. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/265845332_Selection_of_Immature_Bovine_Oocytes_Using_Brilliant_Cresyl_Blue_Enhances_Nuclear_Maturity_after_Vitrification

Hamawaki, A., Kuwayama, M., Hamano, S. (2010). Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. *Theriogenology*, 51, (1), 1028 - 1035. Recuperado de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(99\)91724-7/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(99)91724-7/abstract)

Hendriks, W., Roelen, B., Colenbrander, B., Stout, T. (2015). Cellular damage suffered by equine embryos after exposure to cryoprotectant for cryopreservation by

slow- freezing or vitrification. *Equine veterinary journal*, 47, (6), 701 - 707. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25187202>

Hussein, T., Thompson, J., Gilchrist, R. (2006). Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental Biology*, 296, (2), 514 - 521. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160606009298>

Izaguirre, Elsa. (2012). *Adaptación de un método de vitrificación-Calentamiento en fibreplug para la transferencia directa de blastocistos bovinos producidos in vitro*. Recuperado de <http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/17409/2/TFM%2520ELSA%2520IZAGUIRRE.pdf>

Izquierdo, A., Liera, J., Mancera, A., Perez, J., Arroyo, G., Mosaqueda, M. (2015). Congelación de embriones bovinos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 9, (2), 22 - 40. Recuperado de <https://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/download/51041/47391>

Kamath, M., Muthukumar, K. (2017). Solid Surface Vitrification. En Nagy, Varghese y Agarwal, *Cryopreservation of mammalian gametes and embryos* (297 - 307). New York: Humana press.

Keros, V., Fuller, B. (2015). Cryopreservation of Mammalian Oocytes. En Wolkers y Oldenhof, *Cryopreservation and Freeze - Drying Protocols* (289 - 304). New York: Humana Press.

Keros, V., Xella, S., Hultenby, K., Pettersson, K., Sheikhi, M., Volpe, A., et al. (2009). Vitrification versus controlled- rate freezing in cryopreservation of human ovarian

tissue. *Human Reproduction*, 24, (7), 1670 - 1683. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19359339>

Kim, Y., Uhm, S., Gueta, M., Yang, J., Lim, J., Das, Z., et al. (2012). Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. *Theriogenology*, 78, (5), 1085 - 1093. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X12002762>

Leibo, S. (2008). Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, 69, (1), 37 - 47. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Cryopreservation+of+oocytes+and+embryos%3A+Optimization+by+theoretical+versus+empirical+analysis>

Leon, P., Campos, V., Corcini, C., Santos, E., Rambo, G., Lucia, J., et al. (2012). Cryopreservation of immature equine oocytes, comparing a solid surface vitrification process with open pulled straws and the use of a synthetic ice blocker. *Theriogenology*, 77, (1), 21 - 27. Recuperado de [http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(11\)00327-X/fulltext](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(11)00327-X/fulltext)

Maclellan, L., Carnevale, E., Coutinho, M., Scoggin, C., Bruemmer, J., Squires, E. (2002). Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology*, 58, (5), 911 - 919. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12212891>

Maclellan, L., Stokes, J., Preis, K., Carnevale, E. (2010). Vitrification, warming, ICSI and transfer of equine oocytes matured in vivo. *Animal Reproduction Science*, 121, (1), 260 - 261. Recuperado de

https://www.researchgate.net/publication/285119773_Vitrification_warming_ICSI_and_transfer_of_equine_oocytes_matured_in_vivo

Mara, L., Casu, S., Carta, A., Dattena, M. (2013). Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Animal Reproduction Science*, 138, (1), 25 - 38. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23477753>

Martins, R., Costa, E., Chagas, J., Ignácio, F., Torres, C., McManus, C. (2005). Effects of vitrification of immature bovine oocytes on *in vitro* maturation. *Animal Reproduction Science*, 2, (2), 128 - 134. Recuperado de <http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v2n2/AR041.pdf>

Morató, R., Izquierdo, D., Paramio, M., Mogas, T. (2008). Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology*, 57,(2), 137 - 141. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224008000904>

Moussa, M., Bersinger, I., Doligez, P., Guignot, F., Duchamp, G., Vidament, M., et al. (2005). In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equin embryos: Slow - cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, 64, (7), 1619 - 1632. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05001159>

Nedambale, T., Dinnyés, A., Groen, W., Dobrinsky, J., Tian, X., Yang, X. (2004). Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and

cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 62, (3), 437 - 449.

Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15226000>

Nicole, N., Knopman, J., Labella, P., McCaffrey, C., Grifo, M. (2010). Oocyte cryopreservation outcomes including pre-cryopresevation and post-thaw meiotic spindle evaluation following slow cooling and vitrification of human oocytes. *Fertility and Sterility*, 94, (6), 2078 - 2082. Recuperado de [http://www.fertstert.org/article/S0015-0282\(10\)00079-8/fulltext](http://www.fertstert.org/article/S0015-0282(10)00079-8/fulltext)

Oberstein, N., O'Donovan, M., Bruemmer, J., Seidel, G., Carnevale, E., Squires, E. (2001). Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, 55, (2), 607 - 613. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01004290>

Ochoa, Jose. (2011). Criopreservación de embriones bovinos. Recuperado de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3055/1/mv179.pdf>

Pegg, David. (2015). Principles of Cryopreservation. En Wolkers y Oldenhof, Cryopreservation and Freeze - Drying Protocols (3 - 19). New York: Humana Press.

Pereira, G., Lorenzo, P., Carneiro, G., Bilodeau-Goeseels, S., Kastelic, J., Esteller, A., et al. (2014). Selection of developmentally competent immature equine oocytes with brilliant cresyl blue stain prior to in vitro maturation with equine growth hormone. *Zygote*, 22, (4), 500 - 504. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23369728>

Phillips, P., Jahnke, M. (2016). Embryo Transfer (Techniques, donors, and recipients). *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 32, (2), 365 - 385. Recuperado de [http://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720\(16\)00009-8/fulltext](http://www.vetfood.theclinics.com/article/S0749-0720(16)00009-8/fulltext)

Pope, C., Gómez, M., Kagawa, N., Kuwayama, M., Leibo, S., Dresser, B. (2012). In vitro survival of domestic cat oocytes after vitrification, intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. *Theriogenology*, 77, (3), 531 - 538. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X1100447X>

Rader, K., Choi, Y., Hinrichs, K. (2016). Intracytoplasmic Sperm Injection, Embryo Culture and Transfer of In Vitro - Produced Blastocysts. *The Veterinary clinics of North America: Equine practice*, 32, (3), 401 - 413. Recuperado de [http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739\(16\)30033-5/fulltext](http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739(16)30033-5/fulltext)

Rusciano, G., Canditiis, C., Zito, G., Rubessa, M., Roca, M., Carotenuto, R., et al. (2017). Raman-microscopy investigation of vitrification - induced structural damages in mature bovine oocytes. *PLoS ONE*, 12, (5). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28531193>

Sanchez, R., Blanco, M., Weiss, J., Rosati, L., Herrera, C., Bolwein, H., et al. (2017). influence of embryonic size and manipulation on pregnancy rates of mares after transfer of cryopreserved equine embryos. *Journal of equine veterinary science*, 49, (1), 54 - 59. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080616304592>

Saragusty, J., Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141, (1), 1 - 19. Recuperado de <http://www.reproduction-online.org/content/141/1/1.full.pdf+html>

Silva, D., Rodriguez, P., Galuppo, A., Arruda, N. (2013). Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*, 21, (3), 250 - 255. Recuperado de

<https://www.cambridge.org/core/journals/zygote/article/selection-of-bovine-oocytes-by-brilliant-cresyl-blue-staining-effect-on-meiosis-progression-organelle-distribution-and-embryo-development/3D21A3B0512166789A07C1B33676B1E4>

Sprícigo, J., Morais, K., Ferreira, A., Machado, G., Gomes, A., Rumpf, R., et al. (2014). Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. *Cryobiology*, 69,(2), 256 - 265. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25106744>

Squires, Edward. (2016). Breakthroughs in Equine Embryo Cryopreservation. *The Veterinary clinics of North America: Equine practice*, 32, (3), 415 - 424. Recuperado de [http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739\(16\)30039-6/abstract](http://www.vetequine.theclinics.com/article/S0749-0739(16)30039-6/abstract)

Tharasanit, T., Colleoni, S., Galli, C., Colembrander, B., Stout, T. (2009). Protective effects of the cumulus - corona radiata complex during vitrification of horse oocytes. *Reproduction*, 137, (3), 391 - 401. Recuperado de <http://www.reproduction-online.org/content/137/3/391.full>

Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P., Jacobsen, H., Greve, T. (1998). Open Pulled Straw (OPS) Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos. *Molecular reproduction and development*, 51, (1), 53 - 58. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9712317>

Vajta, G., Nagy, Z. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive Biomedicine Online*, 12, (6), 779 - 96. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310610917>

Vajta, G., Reichart, A., Filippo, U., Rienzi, L. (2013). From a backup technology to a strategy-outlining approach: the success story of cryopreservation. *Expert Review of*

Obstetrics & Gynecology, 8, (2), 181 - 190. Recuperado de <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eog.12.80>

Vajta, Gábor. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 60-61, (1), 357 - 364. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037843200000097X>

Vanderzwalmen, P., Zech, N., Ectors, F., Panagiotidis, Y., Papatheodorou, A., Yannis, P., et al. (2015). Vitrification of oocytes and embryos: Finally a recognized technique, but still a source of concern and debate. En Tucker y Liebermann, *Vitrification in Assisted Reproduction* (23 - 34). Boca Raton: CRC Press.

Vanhuong, D., Walton, S., Catt, S., Robinson, A. (2017). A comparative analysis of the efficacy of three cryopreservation protocols on the survival of in vitro-derived cattle embryos at pronuclear and blastocyst stages. *Cryobiology*, 77, (1), 58 - 63. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28545999>

Vermilyea, M., Brewer, A. (2017). Irvine Scientific® Vitrification System. En Nagy, Varghese y Agarwal, *Cryopreservation of mammalian gametes and embryos* (317 - 334). New York: Humana press.

Villamil, P., Lozano, D., Oviedo, J., Ongaratto, F., Bó, G. (2012). Developmental rates of in vivo and in vitro produced bovine embryos cryopreserved in ethylene glycol based solutions by slow freezing or solid surface vitrification. *Animal Reproduction Science*, 9, (2), 86 - 92. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/64b9/b9a7f345e140d09178396f272b9a5b75bcb4.pdf>

Villamil, P., Ongaratto, F., Moreira, G., Taranco, M., Bó, G. (2016). Vitrification of immature and matured bovine oocytes: effect of brilliant cresyl blue selection and

hyaluronan addition. *Animal Reproduction Science*, 13, (1), 42 - 49. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/304572789_Vitrification_of_immature_and_matured_bovine_oocytes_effect_of_bright_cresyl_blue_selection_and_hyaluronan_addition

Whittingham, David. (1977). Fertilization invitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196 degrees C. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49., 1, 89 - 94. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/833794>

Woods, E., Benson, J., Agca, Y., Critser, J. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48, (2), 146 - 156. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224004000288>

Xueli, Y., Deng, W., Liu, F., Li, Y., Li, X., Zhang, Y., et al. (2010). Closed pulled straw vitrification of in vitro–produced and in vivo-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 73, (4), 474 - 479. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19962180>

Xueli, Y., Yakun, X., Wu, H., Xian, G., Xiao, L., Wen, H., et al. (2015). Successful vitrification of bovine immature oocyte using liquid helium instead of liquid nitrogen as cryogenic liquid. *Theriogenology*, 85, (6), 1090 - 1096. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Successful+vitrification+of+bovine+immature+oocyte+using+liquid+helium+instead+of+liquid+nitrogen+as+cryogenic+liquid>

Zhou, X., Naib, A., Sun, D., Lonergan, P. (2010). Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology*, 61, (1), 66 - 72. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224010000842>