

EFFECTO DE LA EQUILIBRACIÓN Y LA TASA DE ENFRIAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD POST VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES MURINOS

Effect of Equilibration and Cooling Rate on the Post Vitrification Viability of Murine Embryos

Pedro Cabrera^{*1}, Andrés González^{*}, Karelhia García^{*}, Adriana Fernández^{*}, Thaís Díaz^{*}, Yuraima Reyes^{**} e Isis Vivas^{***}

Instituto de Reproducción Animal, **Bioterio, *Cátedra de Estadística. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 4563, Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela*

Correo-E:pedro.cabrera@ucv.ve

Recibido: 16/12/10 - Aprobado: 22/07/11

RESUMEN

La técnica de criopreservación de embriones por vitrificación ha adquirido gran relevancia a nivel mundial debido a lo fácil de su ejecución, a los costos reducidos en equipos requeridos y, además por los altos niveles de viabilidad de embriones post vitrificación. Sin embargo, existe gran variabilidad entre los protocolos reportados, en especial en relación a las etapas de equilibración y enfriamiento. Con el objeto de contribuir al diseño de un protocolo estándar de vitrificación para la criopreservación de embriones murinos, se plantearon los siguientes experimentos: Experimento 1, se estudió el efecto de la tasa de enfriamiento (rápida y muy rápida) y el volumen de la solución ($2\mu\text{L}$ y $1\mu\text{L}$) sobre la viabilidad de embriones murinos post vitrificación, no observando efecto alguno del volumen de la solución ($p > 0,05$), pero sí un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la tasa de enfriamiento. Resaltando, que se obtuvo mejor resultado (81,3% de embriones viables), cuando se utilizó el protocolo de vitrificación Rápido-1 μL . Experimento 2, se evaluó la influencia del número de pasos y tiempo de equilibración sobre la viabilidad de embriones murinos, combinando protocolos de 4 pasos de exposición a los crioprotectores (1, 2, 3 y 4 pasos)

ABSTRACT

The technique of cryopreservation of embryos by vitrification has acquired great relevance worldwide because of the easiness of the process, the low cost of the equipment, and the high levels of viability of the embryos after vitrification. Nevertheless, a great variability exists among the reported protocols, especially in relation to the steps of equilibration and cooling. In order to contribute to the design of a standard protocol of vitrification for murine embryos, the following experiments were conducted. Experiment 1 studied the effect of cooling rate (fast and very fast), and the volume of the solution ($2\mu\text{L}$ and $1\mu\text{L}$) on the viability of murine embryos post vitrification. No effect of the volume of the solution ($p > 0.05$) was observed, but a significant ($p < 0.05$) effect of the cooling rate was shown. Understanding that the best results (81.3% of viable embryos) were obtained when the Fast - $1\mu\text{L}$ protocol of vitrification was used. Experiment 2 evaluated the influence of the number of steps and the equilibration time on the viability of murine embryos, combining four step protocols of exposition to cryoprotectant (1, 2, 3 and 4 steps) and four times of equilibration (5, 10, 15 and 20 min). The highest rate of viability ($p < 0.05$) was obtained with 2 steps-10min (93.8%). In

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

y 4 tiempos de equilibración (5, 10, 15 y 20 min). La mayor tasa de viabilidad ($p < 0,05$) fue obtenida empleando el protocolo 2 pasos-10min (93,8%). En conclusión, la presente investigación aporta detalles para la optimización del protocolo de vitrificación de embriones murinos.

(Palabras clave: Enfriamiento, viabilidad, vitrificación, embriones animales, criopreservación, ratón)

conclusion, the present work gives details for the optimization of the vitrification protocol of murine embryos.

(Key words: Cooling, viability, vitrification, animal embryos, cryopreservation, mice)

INTRODUCCIÓN

A lo largo de las últimas décadas, la criopreservación de embriones se ha consolidado como un procedimiento fundamental para las técnicas de reproducción asistida, tanto en especies domésticas de interés económico, en especies silvestres, así como también en animales de laboratorio (Jin *et al.*, 2008).

La conservación de embriones a bajas temperaturas, con mínimo daño a su viabilidad por tiempo indefinido, permite aumentar el rendimiento del uso de hembras receptoras, ya que los embriones necesitan ser descongelados cuando y donde las receptoras estén disponibles, en el momento apropiado del ciclo estral. Adicionalmente, los embriones congelados pueden ser transportados de un lugar a otro, facilitando el traslado a nivel nacional e internacional, ya que es factible importar y exportar material genético valioso, a bajo costo, con mínimo riesgo de transmisión de enfermedades (Vajta y Kuwayama, 2006).

La mayoría de los embriones son almacenados a través de dos procedimientos de criopreservación, los cuales se pueden clasificar de acuerdo a la velocidad de enfriamiento y calentamiento en congelación: lenta y vitrificación (Leibo, 2008).

La vitrificación surge como un procedimiento alternativo de criopreservación de embriones, a través del cual son incluidos en una solución altamente concentrada de crioprotectores para lograr la solidificación, durante el enfriamiento en pocos segundos, mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido, sin la formación de cristales de hielo. La vitrificación proporciona altas tasas de viabilidad embrionaria y reducidos costos, comparado con la técnica tradicional de congelación lenta (Seki y Mazur, 2009).

Desde las primeras técnicas utilizadas de congelación lenta hasta las más recientes técnicas de vitrificación, todo proceso de criopreservación de embriones causa daño celular; en tal sentido, se reporta daño osmótico y daño al sistema de citoesqueleto (Vajta y Kuwayama, 2006). A pesar de esto, la vitrificación constituye un procedimiento de criopreservación que reduce los daños provocados por la formación de cristales de hielo, aumenta la tasa de viabilidad embrionaria, es de fácil ejecución y no requiere equipos programables de congelación, reduciendo así los costos (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Una de las desventajas de la vitrificación es la variabilidad de protocolos reportados en el ámbito mundial, ya que constituye un proceso influenciado por muchos factores, entre los que destacan: las tasas de enfriamiento y calentamiento, el tipo y concentración de los crioprotectores, el volumen de la muestra a vitrificar, el sistema receptor de la muestra, entre otros, lo cual ha limitado su adopción como técnica de rutina (Shaw y Jones, 2003).

Muchas investigaciones en criobiología utilizan como modelo animal experimental especies roedoras, como el ratón (*Mus musculus*), el cual resulta una excelente alternativa en este tipo de estudios, debido al abundante número de embriones que pueden obtenerse a bajo costo, pudiendo extrapolar los resultados a especies de mayor complejidad y costo de producción, como lo es la especie bovina (Yang *et al.*, 2007).

Con el objeto de contribuir a la optimización del protocolo de vitrificación de embriones, se determinó qué efectos pudieran tener sobre la viabilidad morfológica de embriones murinos, la influencia del volumen de la solución, la velocidad de enfriamiento,

el número de pasos y tiempo de exposición a los crioprotectores durante la equilibración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos de 8 ratones hembra (cepa NIH), fueron simultáneamente estimuladas para cada jornada de colecta, aplicando el protocolo de superovulación de los roedores, colecta y clasificación de los embriones descrito por Cabrera *et al.* (2009).

Para el desarrollo de los experimentos descritos a continuación, se emplearon 640 embriones murinos colectados en estadio de desarrollo de blastocito, de excelente calidad y congelables.

Experimento 1: Efecto del volumen de la solución de vitrificación y la tasa de enfriamiento sobre la viabilidad embrionaria post vitrificación.

Un total de 128 blastocitos fue expuesto a crioprotectores, utilizando tres pasos, con concentraciones crecientes de etilenglicol (EG; *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, EUA) y glicerol (G; *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, EUA) disuelto en solución base compuesta por Medio de Cultivo de Tejido 199 (TCM – 199; *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, EUA) suplementado con suero fetal bovino. Los embriones se expusieron a 10% (v/v) de G durante 5min en el paso uno, 10% (v/v) de G mas 20% (v/v) de EG durante 5min en el paso dos, y finalmente 25% (v/v) de G mas 25% (v/v) de EG durante 30s en el paso tres.

Paralelamente, se procedió a estirar las pajuelas de 250 μ L (*IMV Technologies, L'Aigle*, Francia), según metodología descrita por López-Béjar y López-Gatius (2002) para la técnica de vitrificación mOPS (Pajuelas estiradas abiertas modificadas, por sus siglas en inglés). El estiramiento de la pajuela (aproximadamente 5cm de longitud) tuvo como finalidad reducir el diámetro interno y el grosor de la pared, para de esta forma, aumentar la tasa de enfriamiento y calentamiento.

Con el fin de evaluar si el volumen de la solución contenida en la pajuela y la velocidad a la que es expuesta al nitrógeno líquido influyen sobre la viabilidad embrionaria, se emplearon ocho pajuelas conteniendo cuatro blastocitos, por cada uno de los cuatro tratamientos estudiados. En el tratamiento 1, las pajuelas se aspiraron con un volumen mayor, de aproximadamente una longitud de columna de 10mm (Figura 1), que contiene aproximadamente 2 μ L de solución de vitrificación, utilizándose una tasa de enfriamiento rápida, la cual consta de dos fases; la

primera, consiste en mantener la pajuela en vapores de nitrógeno líquido (aproximadamente -100°C) durante 5 min, utilizando una tasa de enfriamiento de aproximadamente 26°C/min. Posteriormente, durante la segunda fase, se introdujo la pajuela directamente en el material congelante (aproximadamente -196°C), alcanzando una tasa de enfriamiento de aproximadamente 2880°C/min. Es de resaltar que la tasa de enfriamiento desde el inicio del descenso térmico fue de 45°C/min.

En el Tratamiento 2, se utilizó igual número de pajuelas (n=8). En este caso se llenaron con un volumen menor de solución de vitrificación de aproximadamente una longitud de columna de 5mm, que contenía aproximadamente 1 μ L de mezcla crioprotectora (Figura 1), utilizando igualmente una tasa de enfriamiento rápida.

Para los dos Tratamientos restantes (3 y 4), se utilizó una tasa de enfriamiento muy rápida (6780°C/min), la cual consistió en sumergir las pajuelas cargadas con la solución de vitrificación (1 μ L y 2 μ L) directamente en el nitrógeno líquido. En el tercer Tratamiento, se evaluó adicionalmente el volumen mayor (2 μ L) y finalmente para el Tratamiento cuatro, se evaluó el volumen menor (1 μ L).

Luego de la equilibración y el enfriamiento, los pasos restantes de almacenamiento, calentamiento y dilución se realizaron según metodología descrita por Cabrera *et al.* (2008).

Finalmente, la evaluación morfológica de los embriones después de la vitrificación se realizó bajo microscopio invertido (*Axiovert 25 Carl Zeiss*, Alemania) a una magnificación de 200X, con el objeto de determinar la tasa de sobrevivencia o integridad morfológica (Hochi *et al.*, 2001; Ávila-Portillo *et al.*, 2006), o también denominada tasa de embriones morfológicamente viables (Cocero *et al.*, 1996). Esta

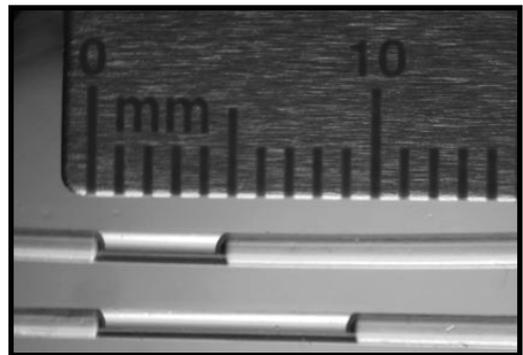


Figura 1. Volumen menor (arriba) y mayor (abajo) de la solución de vitrificación contenido en la pajuela

tasa corresponde al número de embriones con todas las blastómeras morfológicamente intactas, zona pelúcida íntegra post vitrificación y presencia de re-expansión del blastocele (Mukaida *et al.*, 2001), todo esto con base en el número de embriones recuperados post vitrificación (Otsuka *et al.*, 2002), clasificando los tratamientos de acuerdo a la tasa de viabilidad obtenida.

Experimento 2: Efecto del número de pasos durante la equilibración y el tiempo de exposición de los embriones a los crioprotectores sobre la viabilidad morfológica de embriones murinos.

Se emplearon ocho pajuelas conteniendo cuatro blastocitos por cada uno de los 16 tratamientos resultantes de la combinación de los cuatro distintos pasos de exposición a los crioprotectores (1, 2, 3 y 4 pasos) y los cuatro tiempos de equilibración (5, 10, 15 y 20min), utilizando 512 blastocitos en el experimento.

En los tratamientos con un paso de equilibración, se utilizó una solución con 50% de crioprotectores (CP), constituida por 25% de EG y 25% de G. En los tratamientos de dos pasos se empleó 20% de G en el primer paso y 50% de CP en el segundo paso (25% de EG y 25% de G). Para los tratamientos de tres pasos se utilizó 10% de G en el primer paso, 30% de CP en el segundo paso (20% de EG y 10% de G) y 50% de CP en el tercer paso (25% de EG y 25% de G). Finalmente, en los protocolos con cuatro pasos se utilizó 10%, 20%, 40% y 50% de CP, respectivamente, constituido por 10% de G en el primer paso, 10% de EG y 10% de G en el segundo paso. Para el tercer paso, se empleó 20% de EG y 20% de G y por último, 25% de EG y 25% de G en el cuarto paso.

Con relación al tiempo empleado en los distintos protocolos, para los tratamientos con 2, 3 y 4 pasos se dividió el tiempo asignado para cada tratamiento (5, 10, 15 y 20 min) entre los pasos iniciales, utilizando siempre 30s en el último paso. No fue necesario dividir el tiempo asignado en los tratamientos con 1 paso (Tabla 1).

Los embriones fueron aspirados en las pajuelas mOPS con el volumen y tasa de enfriamiento que resultó en mayor viabilidad embrionaria en el experimento 1, procediendo luego del descenso de la temperatura de manera similar al mencionado experimento.

Los datos obtenidos fueron analizados por la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y Tukey,

haciendo uso del Sistema de Análisis Estadístico SAS (1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el experimento 1, con base en los 119 embriones recuperados, la tasa de sobrevivencia morfológica post vitrificación, comparando los dos volúmenes de solución y las dos tasas de enfriamiento estudiadas, se encuentra reflejada en la Tabla 2. Se observa cómo la tasa de enfriamiento tiene influencia significativa ($p < 0,05$) sobre la viabilidad de los blastocitos post vitrificación, para lo cual es necesario el descenso de la temperatura de manera gradual, primero colocando las pajuelas conteniendo los embriones en vapores de nitrógeno líquido, aproximadamente a -100°C , para luego exponerlas a temperaturas de -196°C , al sumergirlas en el material congelante. De esta forma se asegura, en gran proporción, la integridad morfológica de los embriones post vitrificación.

Es interesante resaltar que solo en los protocolos de vitrificación con tasa de enfriamiento muy rápida, hubo presencia de embriones con daños severos en la zona pelúcida. A su vez, se observó un daño marcado en el citoplasma de las blastómeras, indicando que el cambio brusco de la temperatura durante el enfriamiento, deteriora severamente al embrión.

La ruptura física de la zona pelúcida es causada por estrés mecánico producido por los cambios no uniformes de volumen, de la solución de vitrificación, mientras cursan cambios muy rápidos de temperatura. Si el daño físico es limitado a la zona pelúcida, en algunas especies como la murina, esos embriones pueden sobrevivir, pero una zona pelúcida intacta contribuye con la prevención de infecciones durante la transferencia de los embriones (Kasai *et al.*, 1996).

Dicho efecto fue corroborado por Donnay *et al.* (1998), quienes reportaron que las fracturas ocurren cuando soluciones de altas concentraciones son enfriadas rápidamente al sumergirlas abruptamente en nitrógeno líquido. En contraste, en una solución de similares concentraciones, raramente la zona pelúcida se fractura cuando se enfría en los vapores del nitrógeno líquido durante 2 min, seguido luego de la inmersión en nitrógeno líquido.

Por su parte, Han *et al.* (2008) reportaron que la mayor desventaja de colocar la pajuela directamente en nitrógeno líquido, es que provoca una violenta

Tabla 1. Protocolos de vitrificación, de acuerdo al número de pasos y tiempo durante la equilibración

Tiempo de Equilibración	Pasos			
	1	2	3	4
	50% CP	20%- 50% CP	10%- 30%- 50% CP	10%-20%-40%-50% CP
5 min	5 min	5 min-30 s	2,5 min-2,5 min-30 s	1,7 min-1,7 min-1,7 min-30 s
10 min	10 min	10 min-30 s	5 min-5min-30 s	3,3 min-3,3 min-3,3 min-30 s
15 min	15 min	15 min-30 s	7,5 min-7,5 min-30 s	5 min-5 min-5 min-30 s
20 min	20 min	20 min-30 s	10 min-10 min-30 s	6,7min-6,7 min-6,7 min-30 s

vaporización del nitrógeno alrededor de la superficie de la pajueta, formando una especie de “cubierta de vapor”, la cual actúa como una capa aislante de calor, en consecuencia, el coeficiente de transferencia de calor; entre la superficie de la pajueta y el nitrógeno líquido es muy limitado.

Previamente, Kasai *et al.* (1996), no observaron daño a la zona pelúcida de blastocitos murinos al someterlos a enfriamiento en vapores de nitrógeno líquido, aún al exponerlos al tratamiento extremo de diez veces consecutivas al proceso de enfriamiento y calentamiento. Sin embargo, la incidencia de daño de zona pelúcida se incrementó significativamente al sumergir los embriones directamente en el nitrógeno líquido. Por el contrario, Mello *et al.* (1999), obtuvieron mayor tasa de viabilidad embrionaria al someter los embriones directamente en nitrógeno líquido.

En el presente experimento en varias ocasiones, la pajueta fue afectada por este cambio brusco de

temperatura, provocado por la tasa de enfriamiento muy rápida, observándose grietas en la porción más delgada de la misma, poniendo en riesgo la pérdida de la solución de vitrificación que contiene los embriones.

Aunque el volumen de la solución de vitrificación es uno de los factores que determinan la velocidad de enfriamiento, permitiendo alcanzar el estado vítreo y disminuyendo la posibilidad de formación de cristales de hielo (Liebermann *et al.*, 2002), en este experimento no se evidenció efecto ($p > 0,05$) de los dos volúmenes estudiados ($2\mu\text{L}$ y $1\mu\text{L}$). Sin embargo, la combinación de tasa de enfriamiento rápida y volumen de la solución menor, fue la que proporcionó mayor tasa de viabilidad embrionaria (81,3%; $p < 0,05$).

Rios *et al.* (2010), al igual que en este experimento, no encontraron diferencias significativas al comparar dos volúmenes de solución de vitrificación $0,5\mu\text{L}$ y $1\mu\text{L}$. En otra investigación, Yang *et al.* (2007) evaluaron un mayor rango de longitud de la columna de solución de vitrificación, desde 3mm hasta 20mm, demostrando que el volumen de la solución de vitrificación contenido en la pajueta no tiene influencia sobre la viabilidad embrionaria, cuando la longitud de la columna de solución es \leq a 10mm (3, 5, 7 y 10mm). Sin embargo, cuando la longitud de la solución es \geq a 12mm (12, 15, 17 y 20mm), se presentó un descenso de la viabilidad post vitrificación.

En conclusión, aunque el volumen de la solución no tuvo influencia, la tasa de enfriamiento sí afectó la viabilidad embrionaria post vitrificación, ya que embriones sometidos a tasas de enfriamiento rápidas ($45^\circ\text{C}/\text{min}$), presentaron tasas de viabilidad mayores (79%; $p < 0,05$), al compararlas con tasas de viabilidad morfológica menores (7%), logradas al

Tabla 2. Tasa (%) de viabilidad morfológica de embriones murinos post vitrificación de acuerdo a la tasa de enfriamiento y volumen de la solución de vitrificación utilizada

Protocolo de Vitrificación	Embriones recuperados (n)	Embriones viables (%; [n])
Rápido- $1\mu\text{L}$	32	81,3 [26] ^a
Rápido- $2\mu\text{L}$	30	76,7 [23] ^a
Muy Rápido- $1\mu\text{L}$	29	13,8 [4] ^b
Muy Rápido- $2\mu\text{L}$	28	0 [0] ^b
Total	119	

^{a, b} Valores con diferente superíndice en la misma columna, son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

someter los embriones a tasas de enfriamiento muy rápidas (6780°C/min).

En el experimento 2, al evaluar los 469 embriones recuperados, se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tiempos y pasos de exposición a crioprotectores sobre la viabilidad embrionaria post vitrificación (Tabla 3). En tal sentido, al colocar los embriones en contacto, en un solo paso, con los agentes crioprotectores, no se favoreció la viabilidad, ya que ningún embrión presentó morfología normal posterior al proceso de vitrificación.

Al exponer los embriones, en un solo paso, a la alta concentración de crioprotectores de la solución, se crea un cambio osmótico muy brusco en las blastómeras, evidenciado por la contracción inmediata del embrión al tomar contacto con la solución de vitrificación, reduciendo la viabilidad post vitrificación, posiblemente por un excesivo estrés osmótico (Ali y Shelton, 1993). De igual forma, Boggio y Caorsi (2002), vitrificaron embriones ovinos en distintos estadios de desarrollo, utilizando

un solo paso de equilibración, obteniendo porcentajes de viabilidad muy cercanos a cero.

Al aumentar los pasos de equilibración, en este experimento se observó un incremento en la tasa de viabilidad de los embriones. Protocolos con 2, 3 y 4 pasos proporcionaron altas tasas de embriones morfológicamente viables.

Con el Tratamiento 2 pasos-10min se observó la mayor tasa de viabilidad (93,8%; $p < 0,05$) de los embriones post vitrificación, es decir, blastocitos con la zona pelúcida íntegra, blastómeras bien definidas, sin daño aparente en las uniones intercelulares, células del trofoectodermo yuxtapuestas a la zona pelúcida, con reducido espacio perivitelino, re-expansión del blastocele y un macizo celular interno bien delimitado; considerándose éste (2 pasos), el número mínimo necesario para asegurar la viabilidad de los embriones post vitrificación.

Resultados similares obtuvieron López-Béjar y López-Gatius (2000), quienes trabajando con conejos compararon varias soluciones de equilibración en uno o dos pasos, comprobaron que la exposición en varios pasos mejoró la viabilidad *in vitro* de embriones.

A medida que se incrementa el número de pasos en el protocolo, la diferencia de concentración de crioprotectores entre las gotas de equilibración es menor. De esta forma, al utilizar 2 pasos, se emplearon dos concentraciones: 20% y luego 50%. Para 3 pasos se utilizó 10%, 30% y 50%, y por último para 4 pasos se emplearon 10%, 20%, 40% y 50%. En tal sentido, al colocar en contacto los blastocitos en las gotas de crioprotectores, se evidencia, en primer lugar, que los embriones flotan durante aproximadamente 5s, sedimentándose posteriormente en forma lenta en el fondo de la placa, siendo este descenso mucho más lento a medida que la concentración de los crioprotectores es mayor, debido a la viscosidad de la solución.

De igual forma, al sumergirse el embrión en la mezcla crioprotectora se evidencia una pequeña contracción de su diámetro, reduciendo en un 40%, aproximadamente, el volumen isotónico del blastocito, perdiendo la forma esférica y adquiriendo formas elipsoidales durante aproximadamente 1min. Esto debido a que el ambiente hiperosmótico favorece la deshidratación de las células, sabiendo que la permeabilidad de la membrana celular de los embriones al agua es 2000 a 3000 veces mayor que la

Tabla 3. Tasa (%) de viabilidad morfológica de embriones post vitrificación, de acuerdo al número de pasos y tiempo durante la equilibración

Protocolo de Vitrificación	Embriones recuperados (n)	Embriones viables (%; [n])
1 paso-5min	29	0 [0] ^g
1 paso-10min	28	0 [0] ^g
1 paso-15min	32	0 [0] ^g
1 paso-20min	24	0 [0] ^g
2 pasos-5min	28	0 [0] ^g
2 pasos-10min	32	93,8 [30] ^a
2 pasos-15min	30	30,0 [9] ^e
2 pasos-20min	29	0 [0] ^g
3 pasos-5min	29	51,7 [15] ^d
3 pasos-10min	32	81,3 [26] ^b
3 pasos-15min	30	66,7 [20] ^c
3 pasos-20min	28	17,9 [5] ^f
4 pasos-5min	28	85,7 [24] ^b
4 pasos-10min	31	71,0 [22] ^c
4 pasos-15min	29	0 [0] ^g
4 pasos-20min	30	0 [0] ^g
Total	469	

a, b, c, d, e, f, g, Valores con diferente superíndice en la misma columna, son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

del crioprotector más permeable (Kaidi *et al.*, 2000), es decir, el agua abandona la célula más rápidamente que el ingreso del crioprotector a la misma.

La contracción de las blastómeras es detenida al momento de balancear el exflujo de agua y el influjo de crioprotector, seguido de una lenta expansión, a medida que el crioprotector continúa penetrando al citoplasma celular al igual que penetra agua. Estas modificaciones en el volumen del blastocito son repetidas en las siguientes gotas, llegando al más alto grado de deshidratación en la última gota, observándose siempre un diámetro menor de la masa celular, a medida que aumenta la concentración de los crioprotectores. Este comportamiento fue de manera similar descrito por Zhu *et al.* (1993), quienes resaltan que en los protocolos de dos o más pasos estas variaciones en el volumen son graduales, deteriorando en menor intensidad a la célula.

En tal sentido, Kaidi *et al.* (2000) reafirman que la adición y remoción de los crioprotectores debe ser progresiva para reducir el choque osmótico generado por el movimiento rápido de agua a través de la membrana. A su vez, Mahmoudzadeh *et al.* (1995), aseveran que un posible método para reducir los daños por el efecto solución durante la vitrificación, es la exposición de los embriones a los crioprotectores bajo la modalidad de pasos, en los cuales se incrementa sucesivamente la concentración de los crioprotectores, combinado con el descenso del tiempo de exposición.

Con relación al tiempo de exposición a los crioprotectores en este experimento, períodos de equilibración muy prolongados de 20 min, presentaron reducidos niveles de viabilidad embrionaria. Por el contrario, exposiciones de 10 min proporcionaron los mejores resultados. Resultados similares reportan Valdez *et al.* (1990), quienes evaluaron en blastocitos murinos tres tiempos de equilibración (5, 10 y 20min), obteniendo superiores niveles de viabilidad al exponer los embriones a los crioprotectores, durante 10min.

Sin embargo, existen publicaciones que refieren tiempos de exposición reducidos con óptimos resultados, como reseña Koyama *et al.* (2008). Esos investigadores evaluaron dos tiempos de equilibración, utilizando embriones bovinos, quienes probaron un primer tiempo corto, de 1min y uno más prolongado de 5min, en dos pasos; no obteniendo diferencias significativas con relación a

la apariencia morfológica post vitrificación (94,0% y 94,1%, respectivamente). Adicionalmente, sí hubo diferencias con relación a la tasa de re-expansión, siendo mayor para aquellos embriones equilibrados en el período corto (90% y 85,9%, respectivamente). De igual forma, Manjunatha *et al.* (2009), trabajando en embriones bubalinos producidos *in vitro*, reportaron mejores resultados al utilizar 4 min como tiempo de exposición, con un procedimiento de vitrificación en dos pasos con 25% de EG + 25% de G, obteniendo 58,5% y 40,3% de expansión y eclosión, respectivamente, al comparar tres tiempos de exposición (2, 4 y 6 min).

En conclusión, es necesario diseñar protocolos de vitrificación en los que se invierta el menor tiempo posible y con menos manipulación de los embriones, es decir, menos pasos de equilibración, sin detrimento de la viabilidad embrionaria, logrando de esta forma simplificar el proceso. En tal sentido, el protocolo 2 pasos-10min estadísticamente fue superior y reduce la manipulación de los embriones a sólo 2 pasos, considerándose el protocolo de elección en nuestro caso.

REFERENCIAS

- Ali, J.; Shelton, J. 1993. Successful vitrification of day-6 sheep embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 99:65-70.
- Ávila-Portillo, L.; Madero, J.; López, C.; León, M.; Acosta, L.; Gómez, C.; Delgado, L.; Gómez, C.; Lozano, J.; Reguero, M. 2006. Fundamentos de Criopreservación. *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.*, 57:291-300.
- Boggio, J.; Caorsi, C. 2002. Survival of ovine embryos vitrified in 5.5 M ethyleneglycol + 1.0 M sucrose or 1.0 M trehalose. First report in Uruguay. *Theriogenology*, 57:462 (Abstr.).
- Cabrera, P.; Fernández, A.; Bastidas, P.; Perozo, E.; Molina, M.; Bethencourt, A.; Vivas, I.; Reyes, Y.; Díaz, T. 2008. Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad morfológica de embriones murinos. *Zootecnia Trop.*, 26:1-8.
- Cabrera, P.; Fernández, A.; Bastidas, P.; Perozo, E.; Molina, M.; Bethencourt, A.; Vivas, I.; Reyes, Y.; Díaz, T. 2009. Efecto del peso de la donadora sobre la tasa de colecta de embriones murinos (*Mus musculus*). *Zootecnia Trop.*, 27:73-77.
- Cocero, M.; Lopez, A.; Barragan, M.; Picazo, R. 1996. Differences on post – thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology*, 33:502-507.

- Donnay, I.; Auquier, P.; Kaidi, S.; Carolan, C.; Lonergan, P.; Mermillod, P.; Massip, A. 1998. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Anim. Reprod. Sci.*, 52:93-104.
- Han, X.; Ma, H.; Jiao, A.; Critser, J. 2008. Investigations on the heat transport capability of a cryogenic oscillating heat pipe and its application in achieving ultra-fast cooling rates for cell vitrification cryopreservation. *Cryobiology*, 56:195-203.
- Hochi, S.; Akiyama, M.; Minagawa, G.; Kimura, K.; Hanada, A. 2001. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro – matured bovine oocytes. *Cryobiology*, 41:69-73.
- Jin, B.; Kusanagi, K.; Ueda, M.; Seki, S.; Valdez, D.; Edashige, K.; Kasai, M. 2008. Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. *Cryobiology*, 56:233-240.
- Kaidi, S.; Donnay, I.; Lambert, P.; Dessy, F.; Massip, A. 2000. Osmotic behavior of in vitro produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology*, 41:106-115.
- Kasai, M.; Zhu, S.; Pedro, P.; Nakamura, K.; Sakurai T.; Edashige, K. 1996. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology*, 33:459-464.
- Koyama, H.; Sugulle, A.; Dochi, O. 2008. Effect of pre-equilibration time on the survival rate of in vitro – fertilized bovine embryos after vitrification. *Reprod. Fertil. Dev.*, 20:120-121.
- Leibo, S. 2008. Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, 69:37-47.
- Liebermann, J.; Nawroth, F.; Isachenko, V.; Isachenko, E.; Rahimi, G.; Tucker, M. J. 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol. Reprod.*, 67:1671-1680.
- López-Béjar, M.; López-Gatius, F. 2000. In vitro and in vivo survival of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 53:259 (Abstr.).
- López-Béjar, M.; López-Gatius, F. 2002. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology*, 58:1541-1552.
- Mahmoudzadeh, A.; Van Soom, A.; Bols, P.; Ysebaert, M.; De Kruif, A. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *J. Reprod. Fertil.*, 103:33-39.
- Manjunatha, B.; Gupta, P.; Ravindra, J.; Devaraj, M.; Nandi, S. 2009. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. *Vet. J.*, 179:287-291.
- Mello, M.; Queiroz, V.; Assumpção, M.; Tavares, L.; Lima, A.; Buratini, J.; Visintin, J. 1999. Cryopreservation of mouse morulae: A comparison among slow-freezing, quick-freezing and vitrification methods. *Theriogenology*, 51:170 (Abstr.).
- Mukaida, T.; Nakamura, S.; Tomiyama, T.; Wada, S.; Kasai, M.; Takahashi, K. 2001. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil. Steril.*, 76:618-620.
- Otsuka, J.; Takahashi, A.; Nagaoka, M.; Funabashi, H. 2002. Optimal equilibration conditions for practical vitrification of two-cell mouse embryos. *Comparative Medicine*, 52:342-346.
- Rios, G.; Mucci, N.; Kaiser, G.; Alberio R. 2010. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 118:19-24.
- SAS. 1998. SAS/STAT User's guide (Release 6.03). SAS Inst., Inc., Cary, North Carolina.
- Seki, S.; Mazur, P. 2009. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology*, 59:75-82.
- Shaw, J.; Jones, G. 2003. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum. Reprod. Update*, 9:583-605.
- Vajta, G.; Kuwayama, M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65:236-244.
- Valdez, C.; Abas Mazni, O.; Takahashi, Y.; Hishinuma, M.; Kanagawa H. 1990. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 33:627-636.
- Yang, Q.; Hou, Y.; Zhou, G.; Yang, Z.; Zhu, S. 2007. Stepwise in-straw dilution and direct transfer using open pulled straws (OPS) in the mouse: a potential model for field manipulation of vitrified embryos. *J. Reprod. Dev.*, 53:211-218.
- Zhu, S.; Kasai, M.; Otoge, H.; Sakurai, T.; Machida, T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J. Reprod. Fertil.*, 98:139-145.