

# **MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN MEJORA GENÉTICA ANIMAL Y BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

## **Almacenamiento a corto y largo plazo de embriones pronucleares de conejo**

Trabajo de Fin de Máster

Valencia, septiembre de 2020

**Jorge Octavio Solano Aguilar**

**Director:**

**Dr. Francisco Marco Jiménez**

**Universitat Politècnica de València**

**Departamento de Ciencia Animal**

# ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iv</b>
<b>Resum.....</b>	<b>v</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Conejo .....	1
1.2. Crioconservación .....	1
1.3. Vitrificación .....	4
1.4. Almacenamiento líquido.....	5
1.5. Almacenamiento a corto plazo .....	7
1.6. Soluciones Comerciales: Cold Storage Solution .....	12
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1. Animales.....	14
3.2. Obtención de embriones .....	14
3.3. Vitrificación y desvitrificación .....	16
3.4. Análisis Estadísticos .....	16
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>17</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>6. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>26</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Tasas de implantación obtenidas en diferentes experimentos con diferentes medios (Hafez, 1965).....	11
<b>Tabla 2.</b> Evaluación Diaria de Desarrollo In Vitro.....	19

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Medio de cultivo SAGE 1-Step™.....	15
<b>Figura 2.</b> Embriones del grupo Cold24 tras 24h en Cold Storage Solution, muestra lista para el CIV.....	16
<b>Figura 3</b> Evaluación tras 24h de CIV, (a) Cold24, (b) Cold48. ....	17
<b>Figura 4.</b> Evaluación tras 48h de CIV, (a) Control, (b) Cold24, (c) Vitricados, (d) Embrión del grupo Vitricación con daños en la membrana causados por el método de la vitricación. .	18
<b>Figura 5.</b> Evaluación Grupo Control tras 72h de CIV.....	18

## **Resumen**

El almacenamiento de embriones, así como de semen y óvulos ha tenido gran importancia ya que permite la conservación, el transporte e intercambio de material genético de un establecimiento a otro, de un centro de investigación a otro e incluso entre diferentes regiones de un país. Es sabido que en la actualidad, el método de almacenamiento de embriones más efectivo y utilizado es la vitrificación porque permite años de conservación. Sin embargo, es costosa, compleja de realizar, perjudicial para embriones muy tempranos y su transporte es limitado por normas de seguridad con el uso de nitrógeno líquido. Para evitar estos inconvenientes existe el método de conservación a corto plazo en estado líquido a baja temperatura, el cuál es más barato, práctico y no requiere nitrógeno. El objetivo de este trabajo es determinar el tiempo óptimo de almacenamiento a corto plazo en embriones pronucleares de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y comparar el efecto de los métodos de almacenamiento a corto y largo plazo sobre el desarrollo embrionario *in vitro*.

Los embriones fueron recuperados post mortem, 1 día después de la inseminación, en el estadio pronuclear y fueron sometidos a almacenamiento empleando los dos métodos, de corto plazo en medio Cold Storage Solution Belzer UW® a 4°C durante 24, 48 y 72h y de largo plazo vitrificando en una solución de 20% de Etilenglicol y 20% de Dimetilsulfóxido. También un grupo de pronúcleos frescos se cultivó en medio SAGE 1-Step™ con Solución de Albúmina Humana, a 38°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad saturada durante 72h como control. Después del almacenamiento, los embriones se cultivaron *in vitro* bajo las mismas condiciones que el control. Se determinó el tiempo óptimo de almacenamiento a corto plazo, el efecto del almacenamiento a corto y largo plazo y la capacidad de desarrollo embrionario hasta alcanzar el estadio de blastocisto escapando/escapado.

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los grupos de almacenamiento a corto plazo de 24 y 48h (23,5% y 29,9) después del CIV; no obstante, estos dos mostraron una mayor capacidad de desarrollo embrionario y diferencias significativas respecto al almacenamiento corto plazo durante 72h (0,9%) y almacenamiento a largo plazo (7,9%).

### **PALABRAS CLAVE**

Almacenamiento a baja temperatura, vitrificación, pronúcleos, blastocistos, conejo.

## **Abstract**

The embryo, as well as semen and ovule storage has been very great important, since it allows the conservation, transportation and exchange of genetic material from one establishment to another, from research center to another and even between different regions across a country. It is well known that currently, the most effective and widely used embryo storage method is vitrification because it allows years of conservation. However, it is expensive, complex to perform, harmful for early embryos and its transportation is limited by safety regulations with the use of liquid nitrogen. To avoid these drawbacks, the short-term storage method in liquid state at low temperature becomes an alternative, which is cheaper, more practical and does not require nitrogen. The aim of this study is to determine the optimal length of time for short-term storage in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) pronuclear embryos and to compare the effect of short and long-term storage methods on *in vitro* embryonic development.

The embryos were recovered post mortem, 1 day after insemination, in the pronuclear stage and were subjected to storage applying two methods, short-term, in Cold Storage Solution Belzer UW® medium at 4°C during 24, 48 and 72h and long-term, vitrifying in a 20% EthyleneGlycol and 20% Dimethylsulfoxide solution. Also, a group of fresh pronuclei was cultured in SAGE 1-Step™ medium with Human Albumin Solution, at 38°C, 5% CO<sub>2</sub> and saturated humidity for 72h as control. After storage, the embryos were cultured *in vitro* under the same conditions as the control. The optimal short-term storage length of time, the effect of short- and long-term storage, and the capacity of embryonic development until the hatching/perihatching blastocyst stage were determined.

The results did not show significant differences between the 24 and 48h short-term storage groups (23,5% and 29,9%); however, these two groups showed a greater capacity of embryonic development and significant differences with short-term storage for 72h (0,9%) and long-term storage (7,9%).

### **KEYWORDS**

Low temperatura storage, vitrificaci3n, pronuclei, blastocists, rabbit.

## **Resum**

L'emmagatzematge d'embrions, així com de semen i òvuls ha tingut gran importància ja que permet la conservació, el transport i intercanvi de material genètic d'un establiment a un altre, d'un centre d'investigació a un altre i fins i tot entre diferents regions d'un país. És sabut que en l'actualitat, el mètode d'emmagatzematge d'embrions més efectiu i utilitzat és la vitrificació perquè permet anys de conservació. No obstant això, és costosa, complexa de realitzar, perjudicial per a embrions molt primerencs i el seu transport és limitat per normes de seguretat amb l'ús de nitrogen líquid. Per a evitar aquests inconvenients existeix el mètode de conservació a curt termini en estat líquid a baixa temperatura, el qual és més barat, pràctic i no requereix nitrogen. L'objectiu d'aquest treball és determinar el temps òptim d'emmagatzematge a curt termini en embrions pronucleares de conill (*Oryctolagus cuniculus*) i comparar l'efecte dels mètodes d'emmagatzematge a curt i llarg termini sobre el desenvolupament embrionari in vitro.

Els embrions van ser recuperats post mortem, 1 dia després de la inseminació, en l'estadi pronuclear i van ser sotmesos a emmagatzematge emprant els dos mètodes, de curt termini al mig Cold Storage Solution Belzer UW® a 4°C durant 24, 48 i 72h i de llarg termini vitrificant en una solució de 20% de Etilenglicol i 20% de Dimetilsulfòxid. També un grup de pronúcleos frescos es va cultivar al mig SAGE 1-Step™ amb Solució d'Albúmina Humana, a 38°C, 5% CO<sub>2</sub> i humitat saturada durant 72h com a control. Després de l'emmagatzematge, els embrions es van cultivar in vitro sota les mateixes condicions que el control. Es va determinar el temps òptim d'emmagatzematge a curt termini, l'efecte de l'emmagatzematge a curt i llarg termini i la capacitat de desenvolupament embrionari fins a aconseguir l'estadi de blastocisto escapant/escapat.

Els resultats no van mostrar diferències significatives entre els grups d'emmagatzematge a curt termini de 24 i 48h (23,5% i 29,9) després del CIV; no obstant això, aquests dos van mostrar una major capacitat de desenvolupament embrionari i diferències significatives respecte a l'emmagatzematge curt termini durant 72h (0,9%) i emmagatzematge a llarg termini (7,9%).

## **PARAULES CLAU**

Emmagatzematge a baixa temperatura, vitrificació, pronúcleos, blastocistos, conill.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Conejo

El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) pertenece a una categoría de pequeños animales siendo éste el más grande de ellos después del conejo de indias, ratones y ratas (Mapara *et al.*, 2012). El uso de animales grandes, como el bovino, para estudios en conservación, cultivo y transferencia de embriones es interesante ya que sus propiedades bioquímicas y de pre-implantación son similares a las del humano (Ménézo & Hérubel, 2002). Sin embargo, estos animales implican una mayor dificultad en su manejo además de un mayor coste (Fischer *et al.*, 2012; Mapara *et al.*, 2012), haciendo a los roedores más atractivos y el animal ideal para estos propósitos (el 76% de los organismos modelo son roedores) (Fischer *et al.*, 2012). Por su parte, los conejos tienen algunas ventajas sobre los roedores en estudios reproductivos ya que los humanos exhiben procesos biológicos más similares con los de los conejos que con los de los roedores (Graur *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 2012). Desde el siglo XIX, el conejo ha sido utilizado como el mamífero modelo para estudios en embriología y biología reproductiva (Anon, 2010). En la actualidad es el tercer mamífero más utilizado en la Unión Europea (UE) (Anon, 2010). Específicamente, el humano y el conejo comparten cronología en su activación genómica embrionaria, gastrulación y estructura hemocorial. Además, en el conejo es posible conocer los tiempos exactos de fecundación y etapas de la gestación puesto que la especie permite la ovulación inducida (Fischer *et al.*, 2012). Además, otras características como su corto ciclo de vida (gestación, lactación y pubertad) hacen de este animal un modelo ideal (Mapara *et al.*, 2012). Hay que destacar que el conejo presenta un doble útero con dos canales cervicales independientes (Marco-Jiménez & Vicente, 2012), lo que permite hacer transferencias a la misma hembra con embriones de distintos grupos experimentales y en diferentes cuernos uterinos para comparar ambos efectos experimentales, mermando así el efecto materno sobre los resultados (Fischer *et al.*, 2012; Kidder *et al.*, 1999).

De todas las razas o líneas, New Zealand es la más comúnmente utilizada para realizar estudios debido a su fácil manejo y observación, docilidad y buena salud, ya que tienen menos problemas sanitarios en comparación con otras razas (Mapara *et al.*, 2012).

## 1.2. Crioconservación

La criobiología es la ciencia que estudia los efectos que las temperaturas por debajo del punto de congelación ejercen sobre los sistemas biológicos (Woods *et al.*, 2004). Estas

temperaturas permiten la inactivación reversible del metabolismo celular, manteniendo la integridad de la célula ya que no ocurren reacciones en sistemas acuosos a temperaturas de  $-196^{\circ}\text{C}$  (Mazur, 1984). Las únicas reacciones que se dan a  $-196^{\circ}\text{C}$  son la formación de radicales libres y la producción de roturas en macromoléculas debido a la radiación de ionizaciones del fondo (Rice, 1960). Ya que estos métodos inducen la inactividad celular, se ve facilitado el transporte y almacenamiento de espermatozoides, óvulos y embriones para su posterior activación, cultivo y transferencia.

En la crioconservación de gametos, los 3 factores más importantes a tomar en cuenta son los crioprotectores, la velocidad de enfriamiento y la velocidad de calentamiento (Mazur, 1984). Fisiológicamente, el rango de temperatura dentro del que la nucleación ocurre va de  $-10$  a  $20^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo, con el uso de crioprotectores este rango puede disminuir hasta  $-40^{\circ}\text{C}$  (Mazur, 1984). En cuanto a los otros dos factores, la velocidad es importante cuando se altera la temperatura. La velocidad de enfriamiento afecta la probabilidad de cristalización intracelular ya que controla la velocidad del traspaso de agua a través de la membrana (Mazur, 1984). A  $-5^{\circ}\text{C}$ , la célula y el medio que le rodea aún se mantiene sin congelarse debido al efecto de los crioprotectores. Es cuando se alcanzan temperaturas entre  $-5$  y  $-15^{\circ}\text{C}$  que inicia la formación de cristales extracelulares y es por esa razón que esta solución se vuelve más concentrada provocando que el agua fluya desde el interior de la célula hacia afuera, congelándose en el medio externo para alcanzar el equilibrio osmótico (Mazur, 1984; Leibo 2008).

La velocidad de congelación debe ser correspondida con la de descongelación. Cuando las células son congeladas lentamente, la mayor supervivencia es alcanzada si se someten a un proceso descongelación lento. Por el contrario, cuando las células son congeladas rápidamente, su descongelación deberá ser rápida (Mazur, 1984). Si las células son congeladas de manera rápida, podría producirse una acumulación de pequeños cristales, termodinámicamente inestables, que al descongelarse se agruparan para formar cristales más grandes, proceso que recibe el nombre de recristalización (Mazur, 1984; Woods *et al.*, 2004). Así, se recomienda la congelación y descongelación rápida frente a la congelación y descongelación lenta, ya que se reduce el riesgo de recristalización (Mazur, 1984). La congelación lenta es un proceso que implica mantener el equilibrio osmótico, por lo tanto, es importante ajustar las tasas de enfriamiento y congelación durante la criopreservación para evitar el desbalance osmótico entre el medio y la célula (Woods *et al.*, 2004).

A pesar de las grandes ventajas que tiene la criopreservación, cabe mencionar que puede causar importantes daños a la célula (Kopeika *et al.*, 2014). Por un lado, la formación de cristales puede ocasionar lesiones en el plasma celular (Dobrinsky, 1996). Por otro lado, a

bajas temperaturas pueden ocurrir cambios en las propiedades fisicoquímicas de la membrana celular (Mazur, 1984). Esta estructura es un factor muy importante ya que gracias a su permeabilidad permite el intercambio de agua y movimiento de los crioprotectores para mantener así el equilibrio osmótico (Mazur, 2010; Medicine, 2012). También, la membrana celular juega el rol de barrera para prevenir el crecimiento de cristales extracelulares hacia adentro del citoplasma (Rall *et al.*, 1983).

En el caso de los embriones, estos necesitan deshidratarse parcialmente durante la congelación para evitar la formación de cristales que afecten a las estructuras celulares (Mazur, 1984). Para lograr esta deshidratación, es necesario el uso de los agentes crioprotectores (Celestinos & Gatica, 2002). Cuando se congela lentamente, los embriones son sumergidos en un medio pre-equilibrador altamente concentrado de crioprotectores (Woods *et al.*, 2004; Bajo Arenas, 2009). Debido a esta elevada concentración, para entrar en equilibrio, la célula comienza a deshidratarse e introducir crioprotectores, incorporándolos (Bajo Arenas, 2009). Para la criconservación se utilizan dos tipos de crioprotectores, permeables y no permeables.

- **Crioprotectores permeables o intracelulares:** Son de bajo peso molecular. Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG), etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando en ella para ayudar a proteger el citoplasma (Miyake *et al.*, 1993).
- **Crioprotectores impermeables o extracelulares:** De alto peso molecular. polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sucrosa, lactosa, trealosa, afinosa y otros azúcares (Kuleshova *et al.*, 1999), estos compuestos extraen el agua libre intracelular, gracias a la diferencia de presión osmótica y sin entrar a las células; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas en actividad baja de agua.

El uso conjunto de crioprotectores de ambos grupos deshidratan las células de los embriones durante el equilibrio (Sommerfeld & Niemann, 1999).

Los crioprotectores también previenen la deshidratación y degeneración proteica causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el proceso. Para reducir el daño osmótico y tóxico causados por los crioprotectores, debido a la alta concentración de sales, en embriones de bovino se ha dejado de utilizar el G y DMSO para utilizar el EG, solos o en combinación con sucrosa, que es menos tóxico (Douchi *et al.*, 1990; Leeuw *et al.*, 1994). El EG se vuelve una mejor opción entre los crioprotectores debido a que tiene un bajo peso molecular que le permite penetrar más rápido en la célula, requiriendo menor tiempo de exposición reduciendo así el efecto tóxico (Saha *et al.*, 1996). En *morulae* de ratón, EG es el

más utilizado por su alta permeabilidad, mientras que el G es el menos permeable en pronúcleos (Kasai *et al.*, 1996). Sin embargo, también se ha demostrado que es posible reducir el nivel de toxicidad empleando diferentes combinaciones de crioprotectores (Vajta & Kuwayama, 2006; Cocchia *et al.*, 2010; Saragusty & Arav, 2011). Por ejemplo, Ishimori *et al.* (1992) reportaron que una solución con 25% (4.5 mol/l) de EG y 25% (3.5 mol/l) de DMSO fue efectiva para la vitrificación de embriones de ratón y en embriones de bovino (Ishimori *et al.*, 1993). El uso de una solución con 20% (3.6 mol/l) de EG y 20% (2.7 mol/l) de DMSO ha reportado efectividad en *morulae* de conejo (Vicente & Garcia-Ximenez, 1996) y en blastocistos de cabra (El-Gayar *et al.*, 2001).

### 1.3.Vitrificación

La vitrificación es un método alternativo para criopreservar embriones, especialmente de especies sensibles a lesiones causadas por bajas temperaturas (Kuwayama *et al.*, 2000). Este proceso, a diferencia de la congelación lenta, solidifica el medio debido a un alto grado de viscosidad que se adquiere a muy bajas temperaturas, evitando la formación de cristales (Fahy *et al.*, 1984; Vajta, 2000; Vajta & Kuwayama, 2006; Konce, *et al.*, 2014) y reduciendo las lesiones por el enfriamiento (Kasai & Mukaida, 2004). Con la vitrificación se han alcanzado mejores tasas de supervivencia en comparación con el método de congelación de embriones en etapa preimplantacional (Dobrinsky, 1997). Muchas especies de mamíferos, tanto domésticos como no domésticos, han sido exitosamente vitrificados (Dobrinsky, 2002; Leibo & Songsasen, 2002). Sin embargo, la tasa de supervivencia de los embriones post vitrificación-desvitrificación tiende a ser más baja que la de embriones frescos (sin tratamiento térmico) (Dobrinsky, 2002; Leibo & Songsasen, 2002). Por otro lado, los avances tecnológicos han logrado generar tasas de supervivencia más altas para porcino en blastocistos tempranos y *morulae*, estadios que han mostrado mucha sensibilidad al congelamiento convencional (Kuwayama *et al.*, 1997). En conejo, el uso de la vitrificación se ha manifestado como una herramienta eficiente, mostrando tasas de supervivencia al nacimiento entre 25% y 65% (Kasai *et al.*, 1992; Vicente & Garcia-Ximenez, 1994; Vicente *et al.*, 1999; Lopez-Béjar y Lopez-Gatius, 2002; Mocé *et al.*, 2010; Marco-Jiménez *et al.*, 2013; Lavara *et al.*, 2014; Saenz-de-Juano *et al.*, 2014; Marco-Jiménez *et al.*, 2016; Garcia-Dominguez *et al.*, 2020).

Uno de los mayores problemas asociados a la vitrificación es la toxicidad que causa la alta concentración de los crioprotectores para reducir la nucleación de hielo y la cristalización (Fahy *et al.*, 2004; Saragusty & Arav, 2011). Estos crioprotectores están asociados a la toxicidad química y al choque osmótico que pueden producir cambios perjudiciales en el volumen (Arav, 2014). Debido a esto, se han buscado alternativas de vitrificación que

reduzcan el riesgo de toxicidad sin restringir el uso y los beneficios de los crioprotectores. La técnica se ha mejorado aún más para alcanzar una mayor estabilidad gracias a la implementación de métodos como el Congelamiento con Mínimo Volumen (MVC), empleado tanto en humano (Kuwayama & Kato, 2000) como porcino (Esaki *et al.* 2004) y conejo (Hochi *et al.*, 2004; Papis *et al.*, 2009; Marco-Jiménez *et al.*, 2016) o el método de Tamaño Mínimo de Gota (Minimum Drop Size) (García-Domínguez *et al.*, 2020), consiguiendo mayores valores de viabilidad embrionaria (Vajta, 2000). Esaki *et al.* (2004) vitrificaron embriones de porcino (previamente delipados) en estadio blastocisto expandido, empleando el método de congelación con mínimo volumen, que luego fueron cultivados *in vitro* para examinar la supervivencia y su desarrollo. Bajo estas condiciones, se alcanzó una tasa de supervivencia del 70,0%. Este protocolo fue repetido, por el mismo grupo de trabajo, con embriones de 4 células y con *morulae* obteniendo 36,0% y 82,1% (respectivamente) de desarrollo a blastocisto en cultivo *in vitro* (CIV).

La vitrificación es el mejor método de conservación a largo plazo de los embriones de muchas especies. Sin embargo, tanto las estrictas regulaciones de las aerolíneas para transportar termos con nitrógeno líquido como los problemas técnicos que supone transferir embriones vitrificados por métodos no quirúrgicos han llevado a desarrollar nuevas alternativas para almacenar embriones. Una de ellas, es el almacenamiento en estado líquido (Martinez *et al.*, 2019) que además evita los daños en la membrana celular causados por una congelación y descongelación.

#### **1.4.Almacenamiento líquido**

Sin necesidad de utilizar el nitrógeno líquido, es posible almacenar los embriones en medios acuosos bajo condiciones de refrigeración convencional. Enfriar a temperatura de refrigeración (4-5°C) no solo reduce el metabolismo de los embriones, sino que también mantiene la viabilidad en varias especies, en las que se han realizado numerosos estudios de almacenamiento a corto plazo; siendo algunos de los propósitos analizar qué tan efectivo es almacenarlos a una temperatura baja sin congelar, la edad óptima de estos embriones y su tasa máxima de supervivencia alcanzada después del almacenamiento. En estos estudios se han desarrollado en bovino (Trounson *et al.*, 1976; BonDurant *et al.*, 1982; Lindner *et al.*, 1983; Ideta *et al.*, 2013; Ideta *et al.*, 2014), ovino (Harper & Rowson, 1963), conejo (Anderson & Foote, 1975; Hughes & Anderson, 1982; Nishijima *et al.*, 2013), roedor (Wiggins & Ferguson, 1999; Sakurai & Sato, 2005; Takeo *et al.*, 2010; de Dios *et al.*, 2012) y humano (Grau *et al.*, 2013). Debido al alto contenido de lípidos citoplasmáticos en embriones de porcino (Niimura & Ishida, 1980; Nagashima *et al.*, 1994), estos son sustancialmente

susceptibles a temperaturas menores a 15°C (Polge, 1977), por esto no se han incluido en estudios de almacenamiento a temperatura de refrigeración, pero sí de almacenamiento a corto plazo en estado líquido.

En un estudio de Martinez *et al.* (2018) en porcino, comparando *morulae* a 37°C y blastocistos a 25°C durante 72 horas post recuperación, en un medio semi-definido con 0,4% de Albumina de Suero Bovino (BSA), las tasas de supervivencia y eclosión de los embriones fueron mayores cuando se utilizó el medio 0,4% BSA. La inclusión de BSA parece ser fundamental ya que el suero parece concederles a los embriones de porcino una mayor tolerancia al frío (Men *et al.*, 2005). A pesar de que los embriones manifestaron un importante retraso en su desarrollo y mantuvieron su viabilidad *in vitro* como así también su capacidad de desarrollo durante el almacenamiento, muchos de ellos alcanzaron el estadio blastocisto escapado a las 72h. Por esto, tratando de detener por más tiempo el desarrollo de los embriones y prevenir la eclosión durante su almacenamiento, Martinez *et al.* (2019), desarrollaron un estudio más reciente donde nuevamente se empleó el método de almacenamiento de embriones de porcino en estado líquido, utilizando un medio con pH estable y con altas concentraciones de Suero Fetal Bovino (FCS) (50%) o BSA (4%), en estadio mórula y blastocisto no escapado a dos temperaturas (17°C y 20°C), durante 72 h. Posteriormente fueron puestos en CIV por 48h bajo condiciones convencionales de cultivo (38,5°C y 5% de CO<sub>2</sub>) en un medio NCSU-23 pH estable con 10mM HEPES y suplementados con 50% FCS o 4% BSA para evaluar su desarrollo y su capacidad de eclosión. A las 72 h de almacenamiento a 17°C, 52,4% y 59,1% de las *morulae* conservaron su viabilidad en los medios FCS o BSA, respectivamente. Posteriormente, tras las 48h de CIV, la viabilidad disminuyó a 38,1% y 45,4% respectivamente. Aquellos embriones almacenados a 20°C presentaron viabilidad del 100% y 97,8% para los medios FCS o BSA, respectivamente, después de 72 h de preservación líquida. Finalmente, tras las 48h de CIV, la viabilidad fue de 62,5% y 82,2%. En torno al 80% de los embriones almacenados con BSA continuaron con su desarrollo en CIV y las *morulae* incluso llegaron a blastocisto escapado.

A pesar que el desarrollo *in vitro* de los embriones previamente almacenados en estado líquido fue más lento que el de los frescos, quedó demostrado que el almacenamiento en estado líquido a baja temperatura es eficaz en porcino para prevenir la eclosión de los embriones independientemente del medio (50% FCS o 4%BSA) o la temperatura (17°C o 20°C) utilizados y que los embriones almacenados a 17°C presentaron un menor desarrollo *in vitro* que aquellos almacenados a 20°C siendo menos susceptibles a esta temperatura.

Aunque estos embriones manifestaron un importante retraso en su desarrollo, muchos de ellos eclosionaron/escaparon a las 72h, imposibilitando su transporte dadas las restricciones

de este. Por tal motivo, es necesario utilizar un método de almacenamiento en estado líquido que detenga o retrase el desarrollo embrionario por más tiempo evitando que los embriones escapen durante el transporte (Martinez *et al.*, 2019).

### **1.5. Almacenamiento a corto plazo**

Otra alternativa para inhibir la actividad metabólica manteniendo la viabilidad en los embriones es el almacenamiento a corto plazo por refrigeración (short-term storage), método de almacenamiento más simple, práctico y económico que la vitrificación. Así, se ha descrito el almacenamiento de embriones preimplantados en conejos (Chang, 1947, 1948), vacuno (BonDurant *et al.*, 1982; Lindner *et al.*, 1983), ovinos (Harper & Rowson, 1963), y en roedores (Kasai *et al.*, 1983; Herr & Wright, 1988; Nakamura & Tsunoda 1992; Wiggins & Ferguson, 1999; Tsuchiya *et al.*, 2001). No obstante, la tasa de éxito depende fuertemente de la especie, la etapa de desarrollo de los embriones, la metodología (Sakurai *et al.*, 2005) e incluso la raza (BonDurant *et al.*, 1982).

El almacenamiento a corto plazo para el transporte de embriones es un procedimiento rutinario en los programas de transferencia de embriones en equinos (Gastal *et al.*, 2018). La tasa de éxito tras la transferencia de embriones que han sido almacenados para el transporte nocturno varía de acuerdo con los diferentes protocolos (Gastal *et al.*, 2018). Los embriones equinos son refrigerados para su almacenamiento a corto plazo y transportados para la transferencia a receptoras de otras regiones. El descenso de la temperatura ambiente para los embriones causa que su metabolismo sea más lento y por ende no permite que avance a la siguiente etapa embrionaria o que aumente su diámetro durante el almacenamiento a 5°C (McCue, 2014). Sertich *et al.* (1988) almacenaron embriones de equinos a los 7 días post ovulación utilizando solución salina tampón de fosfato (PBS) a 4°C con 1% de Suero de Ternero Recién Nacido (Newborn Calf Serum) y 0,4% de BSA como medio de almacenamiento, dentro de tubos de ensayo de poliestireno de 4ml; colocados en un contenedor para transporte de semen comercial, a 4-6°C durante 24h. Un total de 32 embriones, 16 sometidos a almacenamiento y 16 frescos, fueron transferidos a las receptoras. Posteriormente, 14 días después de la transferencia, se realizaron ecografías en las receptoras; detectando 6 vesículas de embriones almacenados, de las cuales 3 (18,75%) llegaron al nacimiento como potrillos normales. Por su parte, en las receptoras de embriones frescos, se obtuvieron 5 potrillos normales (31,25%).

Carney *et al.* (1991) lograron almacenar con éxito embriones equinos en refrigeración hasta 24h. En su estudio compararon las tasas de preñez obtenidas a partir de embriones recuperados 7 días post ovulación y transferidos directamente (en fresco) o después de ser

almacenados (durante <12h o >12h) en medio F-10 de Ham con 10% FCS en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub> y empacados en un contenedor de refrigeración a 5°C; para su transporte aéreo, desde diferentes regiones de EE.UU., hasta los laboratorios de la Universidad de Colorado (Colorado, EE.UU.). Los embriones se transfirieron a 3 grupos de hembras receptoras que ovularon 1 o 2 días antes, el mismo día, y 1-3 días después respecto a las donantes. A los 12 días de la ovulación de las donantes, las ecografías realizadas en las receptoras mostraron porcentajes de preñez de 74% con embriones frescos y 80% con embriones almacenados. Las pérdidas fetales entre los 12 y 35 días después de la ovulación fueron mayores en los embriones almacenados por >12h (25%) que en los almacenados por <12h (10%), pero esta diferencia en la duración de almacenamiento no alteró la tasa de preñez a los 12 días post ovulación. El almacenamiento a 5°C durante 24 h fue eficiente sin disminuir la fertilidad en comparación con embriones transferidos en fresco.

Diaz *et al.* (2018), con el objetivo de determinar si los embriones equinos eran capaces de resistir el almacenamiento corto plazo para su transporte desde las granjas hasta centros especializados en crioconservación, evaluaron tasas de preñez empleando embriones que pasaron por dicho almacenamiento, transporte y vitrificación antes de ser transferidos. Utilizando embriones recuperados 7 u 8 días post ovulación y refrigerados a 9-12°C durante 12h o 24h, estos autores registraron tasas de preñez de 55,5% y 75% respectivamente para embriones de día 7; mientras que para embriones de día 8 las tasas fueron 0% y 16,6%. Estos resultados demostraron que, efectivamente, se podían transportar los embriones bajo condiciones de refrigeración antes de la crioconservación y aun así obtener tasas aceptables de preñez, siempre y cuando los embriones fueran recuperados 7 días después de la ovulación. Esto último indica que la edad y etapa de desarrollo de los embriones juegan un papel de gran importancia en la viabilidad cuando se van a someter a temperaturas de refrigeración por corto periodo de tiempo. Ya que uno de los factores importantes en los que se busca acertar es la etapa de desarrollo embrionario óptima para una supervivencia favorable, este se ha evaluado en varios estudios. En bovino, Lindner *et al.* (1983) observaron que la supervivencia de blastocistos almacenados a 4°C durante 48h es similar a la de blastocistos no almacenados. Hughes & Anderson (1982) lograron mantener embriones de conejo a 4°C por hasta 15 días. Generalmente la viabilidad de los embriones decrece a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento, cuando son almacenados a temperaturas bajas (0-10°C). Otoi *et al.* (1999) encontraron una relación entre la pérdida de desarrollo del embrión a 4°C y un aumento en el número de células necróticas. Sakurai *et al.* (2005) tenían la hipótesis que la exposición de los embriones a bajas temperaturas (lo cual los hace metabólicamente inactivos) podría extender o interrumpir temporalmente algunos eventos metabólicos asociados con la fertilidad, replicación del ADN, activación del gen cigótico,

(ZGA), asociación estrecha de pronúcleos masculinos y femeninos, reprogramación del genoma como así también la herencia y expresión de ARN's y proteínas maternas.

Por su alto valor comercial, una de las especies en las que se han puesto en marcha diferentes tipos de almacenamiento de embriones y material genético es el bovino. BonDurant *et al.* (1982) almacenaron 113 embriones bovinos de 5-8 días de edad, en PBS a 4°C. Después del almacenamiento, los embriones pasaron a CIV durante 8-12h a 37°C. Posteriormente a su clasificación morfológica y selección fueron transferidos a madres receptoras por varios métodos diseñados para alcanzar preñez gemelar. De los 113 embriones iniciales, el 42% fue transferible. La tasa de supervivencia general de aquellos embriones almacenados, respecto a embriones transferidos directamente (control) (34% y 48% respectivamente), no mostraba una diferencia significativa. Lindner *et al.* (1983) estudiaron la tasa de supervivencia de embriones bovinos transferidos en fresco frente a embriones almacenados a 4°C en estadio blastocisto y sometidos a CIV a 37°C, comparando diferentes tiempos de almacenamiento. La supervivencia *in vitro* de los embriones almacenados por 1 día y supervivencia *in vivo* de los frescos no difirió. Sin embargo, la supervivencia *in vitro* comenzó a decrecer progresivamente tras las 48h de almacenamiento. Para los embriones almacenados durante 3 y 5 días, la supervivencia *in vitro* fue del 50%; sin embargo, estos fueron asociados a bajas tasas de preñez (Lindner *et al.*, 1983).

El almacenar un embrión a temperatura de refrigeración permitiría su transporte, como así también reduciría sus costos, especialmente dentro de un mismo país cuando su viabilidad se mantiene después de 24h e incluso de 48h. En el caso del ratón, se ha demostrado que los embriones aun después de las 48h a temperatura de refrigeración mantienen la capacidad de generar descendencia (Ge *et al.*, 2019). Hughes y Anderson (1982) almacenaron embriones de conejo a 4°C sin pérdidas significativas de viabilidad tras 7 días, tanto *in vitro* (cultivadas 37°C) como *in vivo* (transferidas a hembras receptoras). No obstante, si hubo pérdidas cuando se almacenaron por más de 10 días antes de cultivar a 37°C (Hughes & Anderson, 1982). Uno de los estudios con resultados más alentadores, respecto al almacenamiento de embriones de conejo a corto plazo, fue realizado por Kardymowicz (1962); en el cual, 16 embriones fueron almacenados por 7 días a 6-12°C y transferidos. Del total de embriones, solo 4 de ellos (25%) se desarrollaron hasta alcanzar el nacimiento. Un resultado similar fue reportado por Hafez (1963; 1965), quien, tras almacenar y transferir 68 embriones, consiguió una tasa de implantación del 53% (36 embriones respecto al total) y una viabilidad del 31% (21 embriones respecto al total) a la autopsia a los 15 días post *coitum*.

Además de la etapa de desarrollo embrionario óptima para el almacenamiento a temperatura de refrigeración, otro factor de gran importancia es el medio en donde se mantienen los

embriones. El medio utilizado en el estudio de Diaz *et al.* (2018) para mantener los embriones en refrigeración fue la solución de retención EMCARE (ICPBio, Timaru, Nueva Zelanda), que contiene 0.4% BSA. Anteriormente, Hafez (1965) almacenó óvulos a 10-20°C bajo diferentes condiciones experimentales y con distintos medios; obteniendo varios resultados respecto a las tasas de implantación, todos ellos dentro del rango 0-71% (Tabla 1). En este estudio, Hafez (1965) logró alcanzar la mayor tasa de implantación (71%) a los 8 días post *coitum* utilizando un medio compuesto por suero sanguíneo homólogo recién preparado y solución fisiológica salina con glicerol (2%) durante un periodo de almacenamiento de los óvulos de 48h a 10°C. También se consiguió, con solo 1% de gelatina, un 22% de implantación (Hafez, 1965); mientras que utilizando clara de huevo, no se obtuvo supervivencia *in vivo*. Por su parte, BonDurant *et al.* (1982) utilizaron PBS a 4°C obteniendo resultados de supervivencia dentro del mismo rango (48%). Para pronúcleos de ratón, Sakurai *et al.* (2005) utilizaron 30  $\mu$ l de Hepes-KSOM cubierto con aceite de parafina, almacenándolos a 4°C, con resultados dentro del rango entre 33,3% y 94,5% de supervivencia *in vitro*.

**Tabla 1.** Tasas de implantación obtenidas en diferentes experimentos con diferentes medios (Hafez, 1965).

<b>Experimento</b>	<b>Medio(s)</b>	<b>Condiciones de almacenamiento</b>	<b>Resultados (Porcentaje de implantación)</b>
I	suero y solución salina (1:1) + 7% de gelatina	7 días a 10°C	53%
II	Gelatina (7%) con o sin antibióticos	14 días	Una implantación sin supervivencia a la autopsia
III	Suero sanguíneo homólogo recién preparado y solución fisiológica salina, con glicerol (2, 5 y 7%)	48 h a 10°C	71% 58% 13%
IV	Suero sanguíneo y solución salina (1:1), mezcla saturada con nitrógeno	48 h a 10°C 48 h a 20°C	58% 29%
V	Suero sanguíneo previamente congelado durante 7 o 30 días	Sin Dato	47 % 41%
VI	Suero liofilizado y reconstituido con agua destilada	48 h a 10°C	64%
VII	fluido de blastocisto o fluido placentario, diluidos en solución fisiológica salina (1:1)	7 días 2 días	44% 24%
VIII	yema diluida 1:1 en 2,9% de citrato de sodio (deshidratado) o clara de huevo diluida 1:1 en solución de Tyrode.	Sin Dato	15% 0%
IX	200 µg/ml de etil-5-metil-benzimidazol disuelto en solución fisiológica salina estéril y mezclada 1:1 con suero sanguíneo fresco (Tranquilizante).	7 días	7%

## **1.6.Soluciones Comerciales: Cold Storage Solution**

Cuando se trata de almacenamiento de órganos en frío, una de las soluciones comerciales más empleada es Belzer UW® Cold Storage Solution (Universidad de Wisconsin, n.d.). Se trata de una solución transparente-amarillenta clara, estéril y apirógena, para la irrigación y almacenamiento hipotérmico de órganos como riñones, hígado y páncreas. La solución tiene una osmolaridad de 320 mosmol/kg, una concentración de sodio de 29 mEq/l, una concentración de potasio de 125 mEq/L y un pH de aproximadamente 7,4 a 20°C. Esta solución permite, además del almacenamiento, el transporte hipotérmico y el posterior trasplante a su receptor. Además, enfría eficazmente el órgano y disminuye sus necesidades metabólicas siempre y cuando conserve la temperatura recomendada (entre 2 y 25°C) (Belzer, 2019).

## 2. OBJETIVOS

A partir de lo expuesto anteriormente, los propósitos de este estudio son:

- Determinar el tiempo óptimo de almacenamiento a corto plazo en embriones pronucleares de conejo.
- Evaluar el efecto del almacenamiento a corto y largo plazo sobre el desarrollo *in vitro* de embriones pronucleares de conejo.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Animales

Se utilizaron conejas de 5 meses de edad de la línea amarilla de la granja experimental de la Universidad Politécnica de Valencia de origen New Zealand, estabuladas individualmente en jaulas convencionales (700 x 500 x 320mm), bajo un fotoperiodo controlado de 16 horas de luz:8 horas de oscuridad, temperatura supervisada (mínima de 17, 5°C y máxima de 25,5°C) y alimentadas con dieta comercial.

### 3.2. Obtención de embriones

El día 0 del experimento un total de 20 conejas se trató con Elonva (Corifolitropina alfa en una dosis de 3  $\mu$ g/hembra) con el objetivo de inducir la superovulación y utilizarlas como donantes. Después de 72 horas, las hembras fueron inseminadas artificialmente con 0,5 ml de una mezcla heterospérmica de semen fresco (a una concentración de 40x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml). El semen se recuperó el mismo día de la inseminación con el uso de vagina artificial siguiendo el método de Vicente *et al.*, (2011). La motilidad se observó a temperatura ambiente utilizando un microscopio de contraste de fase a una magnitud de 40x. Solo aquellos eyaculados con  $\geq$ 70% de esperma mótil fueron utilizados. La inseminación se practicó con ayuda de cánulas plásticas de 22 cm, una por cada coneja, unida a una jeringa para depositar el semen dentro del tracto (fondo de vagina). Inmediatamente después de depositar el semen, se les aplicó a las conejas una inyección intramuscular de 0,2 ml GnRh, 1 $\mu$ g de Acetato de Buserelina (análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas – GnRH, Hoechst Marion Roussel S.A., Madrid, España) para inducir la ovulación.

Entre 18-20 horas post-inseminación, las hembras fueron eutanasiadas. La obtención de embriones en estadio de pronúcleos se llevó a cabo por lavado oviductal a partir de los tractos reproductores recuperados de las hembras. Para ello se utilizó una Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco (DPBS) suplementado con BSA, MgCl<sub>2</sub> (cloruro magnésico), CaCl<sub>2</sub> (cloruro cálcico) y antibióticos (penicilina G sodio 300.000 UI, penicilina G procaína 700.000 UI, y sulfato de dehidroestreptomicina 1250mg; Penivet 1; Divasa Farmavic, Barcelona, España). Estos embriones fueron lavados y evaluados con un stereomicroscopio y solo aquellos que presentaban una condición morfológica normal, según la clasificación de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, fueron seleccionados.

Posteriormente los embriones fueron distribuidos en 5 grupos, de acuerdo con los diferentes tratamientos según se detalla a continuación:

- Control (Embriones frescos)
- Cold 24 horas (Cold24)
- Cold 48 horas (Cold48)
- Cold 72 horas (Cold72)
- Vitrificados

Los grupos Cold24, Cold48, y Cold72 fueron colocados en la solución Cold Storage y almacenados a 4°C por 24h, 48h y 72h, respectivamente. El grupo Vitrificados, fue sometido al procedimiento de vitrificación y desvitrificación. El grupo control fue directamente sometido al cultivo en el medio SAGE 1-Step™ (Figura 1) a 38°C, 5% CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. Los grupos Vitrificados, Cold24, Cold48 y Cold72 pasaron a CIV bajo las mismas condiciones que el grupo control (Figura 2).



**Figura 1.** Medio de cultivo SAGE 1-Step™.



**Figura 2.** Embriones del grupo Cold24 tras 24h en Cold Storage Solution, muestra lista para el CIV.

### **3.3. Vitrificación y desvitrificación**

Una vez evaluados los pronúcleos destinados al grupo de vitrificados, se vitrificaron siguiendo el procedimiento descrito por Vicente *et al.* (1999). Brevemente, la vitrificación se realizó en 2 pasos: Equilibrio, que consistía en 10% [v/v] Etilenglicol y 10% [v/v] Dimetilsulfóxido disueltos en Medio Base (MB) (DPBS suplementado con 0.2% [p/v] de BSA) donde los embriones permanecen entre 2-5 minutos; y Vitrificación que consistió en 20% [v/v] Etilenglicol y 20% [v/v] Dimetilsulfóxido disueltos en MB donde los embriones permanecen menos de 1 minuto para ser colocados en un soporte Cryotop y dentro de un termo con nitrógeno líquido.

Después de la vitrificación, este grupo se desvitrificó sumergiendo el soporte directamente en solución de desvitrificación que consistió en 0.3M sacarosa en MB a temperatura ambiente (25°C), durante 5 minutos para ser transferidos a una placa Nunc para su cultivo.

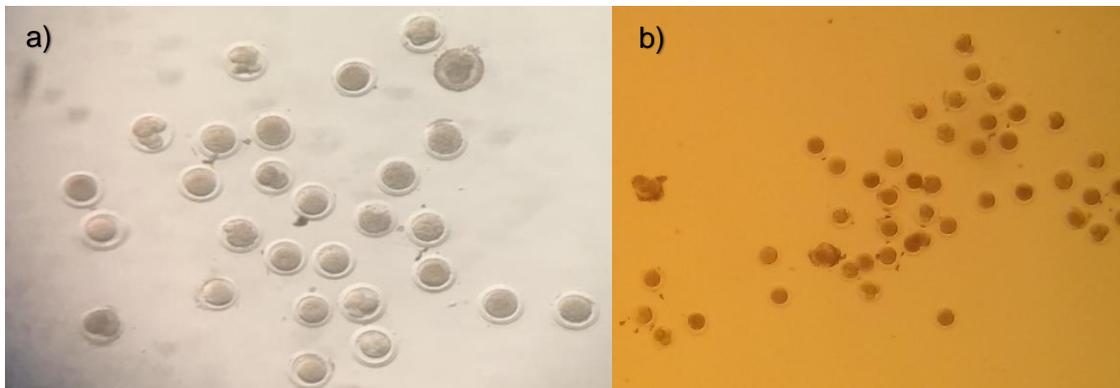
### **3.4. Análisis Estadísticos**

El desarrollo embrionario hasta las 72h para cada grupo experimental fue analizado por medio de pruebas chi-cuadrado. Los análisis fueron realizados usando el programa SPSS Statistics 22. Diferencias de  $P < 0.05$  fueron consideradas significativas.

## 4. RESULTADOS

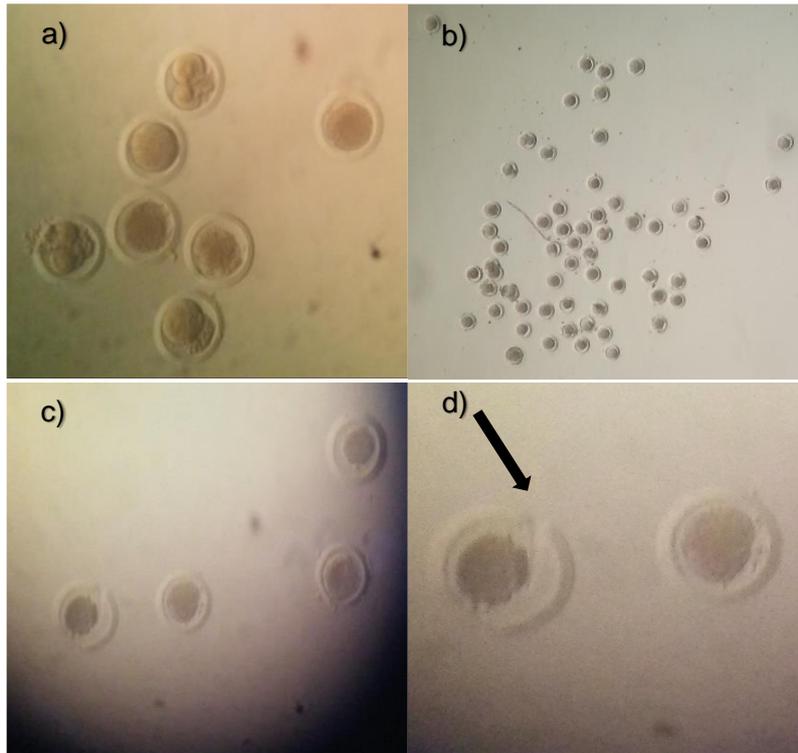
Un total de 593 pronúcleos fueron cultivados (119 para Cold24, 117 para Cold48, 110 para Cold72, 101 para vitrificados y 146 para el lote control).

A las 24 horas de cultivo, tras la primera evaluación de desarrollo *in vitro*, en el grupo control se observó el mayor porcentaje de desarrollo (95.9%) comparado con el resto de los grupos. El grupo Cold24 superó en desarrollo al grupo Cold48 (58.8% frente a 38.5% respectivamente) y fueron significativamente diferentes entre sí (valor  $P < 0.05$ ). Los grupos Cold72 y Vitrificados no difirieron entre sí (13.6% y 12.9%), pero sí respecto a los demás grupos (Tabla 2).



**Figura 3** Evaluación tras 24h de CIV, (a) Cold24, (b) Cold48.

A las 48 horas, durante la segunda evaluación del desarrollo *in vitro*, el grupo control mantuvo el más alto porcentaje de desarrollo (94.5%). El grupo Cold24 (52.9%) siguió presentando el porcentaje más alto respecto a los grupos de almacenamiento, seguido por el grupo Cold48 (36.8%), estos dos no fueron diferentes entre sí en este tiempo de cultivo, pero sí fueron diferentes al resto de grupos. El desarrollo del grupo Cold72 demostró un fuerte descenso de la capacidad de desarrollo (de 13.6% a 1.8%) (Tabla 2), siendo similar al grupo Vitrificados (7.9%, Tabla 2).



**Figura 4.** Evaluación tras 48h de CIV, (a) Control, (b) Cold24, (c) Vitrificados, (d) Embrión del grupo Vitrificación con daños en la membrana causados por el método de la vitrificación.

A las 72 horas de cultivo, el grupo control disminuyó levemente el porcentaje de desarrollo (de 94.5% a 93.8%), pero siguió siendo superior y significativamente diferente a los demás grupos. A diferencia de los resultados de la evaluación anterior, en esta, el grupo Cold24 (23.5%) presentó un porcentaje de desarrollo menor que el grupo Cold48 (29.9%), sin embargo, estos no fueron estadísticamente diferentes. Los grupos Cold72 y Vitrificados mantuvieron los porcentajes de desarrollo más bajos del experimento (0.9% y 7.9% respectivamente) sin mostrar diferencias estadísticas entre sí (Tabla 2).



**Figura 5.** Evaluación Grupo Control tras 72h de CIV.

**Tabla 2.** Evaluación Diaria de Desarrollo *In Vitro*

<b>GRUPO EXPERIMENTAL</b>	<b>N</b>	<b>TIEMPO DE CULTIVO</b>		
		<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>Control</b>	146	95.9 <sup>a</sup>	94.5 <sup>a</sup>	93.8 <sup>a</sup>
<b>Cold24</b>	119	58.8 <sup>b</sup>	52.9 <sup>b</sup>	23.5 <sup>b</sup>
<b>Cold48</b>	117	38.5 <sup>c</sup>	36.8 <sup>b</sup>	29.9 <sup>b</sup>
<b>Cold72</b>	110	13.6 <sup>d</sup>	1.8 <sup>c</sup>	0.9 <sup>c</sup>
<b>Vitrificados</b>	101	12.9 <sup>d</sup>	7.9 <sup>c</sup>	7.9 <sup>c</sup>

N: número total de embriones. <sup>a, b, c, d</sup> Valores con diferente superíndice en la misma columna, son estadísticamente diferentes (P>0.05).

## 5. DISCUSIÓN

En vista de la gran importancia que tiene el almacenamiento de embriones, tanto para comercio como para investigación, se han realizado diversos estudios durante décadas, tratando de mejorar los métodos existentes y desarrollar nuevos. Estos traen especiales ventajas ya que cuando no se busca hacer una transferencia de embriones inmediatamente después de su recuperación o en el mismo lugar, y se requiere el transporte, sin dudas se acude al almacenamiento de los embriones, al menos hasta que estos lleguen a su destino (Martinez *et al.*, 2014). Para llevar a cabo el almacenamiento se recurre a disminuir la temperatura del medio y así conservar mejor sin que los embriones continúen con su desarrollo normal. Chang (1947, 1948) y Hafez (1965) almacenaron embriones de conejo, así como otros autores lo hicieron con embriones de oveja a baja temperatura (0-10°C) (Averill 1956; Kardymowicz *et al.* 1963; Kardymowicz, Kardymowicz & Grochowalski 1966). Takeo *et al.* (2010) lograron transportar embriones de ratón en estadio de 2 células a temperatura de refrigeración durante 48-52h y aun así se obtuvo de estos un número favorable de crías. En cuanto al almacenamiento a largo plazo, se han realizado muchos estudios vitrificando embriones tanto de humano como de otras especies, domésticas y no domésticas (Dobrinsky, 2002). Desai *et al.* (2008) comparó embriones vitrificados de ratón y de humano. AbdelHafez (2011) vitrificó con mucho éxito embriones de ratón, que, si bien es una especie utilizada en investigación, sus estudios generan información para facilitar el transporte y por ende aportan al comercio de embriones de otras especies. Smorag *et al.* (1989) buscaban determinar la susceptibilidad de los embriones de conejo siendo vitrificados en diferentes estadios de desarrollo. Kuwayama *et al.* (1992) realizaron vitrificaciones con diferentes protocolos en embriones producidos *in vitro*, aportando a los avances de una de las especies comerciales más importantes: el bovino.

Sabiendo que la vitrificación es útil cuando se busca conservar a largo plazo, si el propósito de los embriones es ser transferido lo antes posible, en otra región del país o incluso en otro país, 24h de almacenamiento (desde su recuperación) deberían ser suficientes (Martinez *et al.*, 2014) y por lo tanto la vitrificación, bajo estas condiciones se tornaría innecesaria. Para estos casos lo más práctico y económico sería el almacenamiento a corto plazo en estado líquido, en un medio con condiciones que eviten o retrasen la eclosión de los embriones (Martinez *et al.*, 2019), es decir que aún se realice a bajas temperaturas mas no congelando. Con este método el proceso de manipulación de los embriones es más simple y menos brusco. Sumado a esto la obtención del material es más fácil ya que una vez que se tiene el medio, los embriones se pueden mantener sin problema en un refrigerador convencional a 4°C (Hughes & Anderson 1982) o en un recipiente cerrado que mantenga constantemente esa temperatura. Este proceso, aun siendo considerado “a corto plazo” podría extenderse de

24h a 3 días en ratón (Takeo *et al.*, 2010) y bovino (Lindner *et al.*, 1983); e incluso hasta 1 semana como plantean BonDurant *et al.* (1982) y Kardymowicz (1962) por esto mismo se consideró posible almacenar embriones por más de 24h para el presente estudio. Además, el almacenamiento a corto plazo podría reducir la pérdida embrionaria causada por toxicidad (como sucede con el uso de crioprotectores) ya que puede realizarse utilizando medios como KSOM suplementado con BSA que fue utilizado por Ge *et al.* (2019), PBS (BonDurant *et al.*, 1982) o como es el caso en este estudio: SAGE 1-Step™, evitando el uso y, por tanto, el efecto nocivo de los crioprotectores, el uso de termos costosos y sofisticados para el transporte y por supuesto el uso de nitrógeno líquido y su constante recarga.

El método de conservación a largo plazo sigue siendo el más utilizado en la actualidad, y para la mayoría de los intereses es más conveniente. La crioconservación por vitrificación es el primero que se emplea cuando se quiere transportar embriones a largas distancias o cuando se quieren conservar por mucho tiempo, incluso por años. De esta manera, no solo se mantiene la viabilidad sino también se evita o detiene el desarrollo embrionario y por supuesto su eclosión; confiriéndole a los embriones una atmósfera acuosa y a tal baja temperatura (-196°C) durante la crioconservación (Mazur, 1984). Con el paso de los años se han realizado estudios en almacenamiento a corto plazo a baja temperatura. Chang (1947) fue uno de los precursores del almacenamiento de embriones mamíferos a baja temperatura. Kardymowicz (1962) almacenó embriones de conejo durante 12 días a 6-7°C, obteniendo una tasa de supervivencia (25%) muy similar a la que se observó en los grupos almacenados durante 24 y 48h en nuestro estudio (29.9% y 23.5%). A Pesar de almacenar nuestros embriones durante menor cantidad de tiempo, estos no respondieron bien a partir de las 72h de almacenamiento (0,9% de supervivencia). Por su parte, Hafez (1963; 1965) reportó que, de un total de 68 embriones almacenados, que fueron transferidos, 36 (53%) se implantaron y 21 (31%) fueron viables a la autopsia 15 días post coito.

En bovino, estudios como el de BonDurant *et al.* (1982) con embriones de 5-8 días de edad (estadios mórula compacta a blastocisto) almacenados a 4°C en PBS y cultivados durante 8-12h a 37°C obtuvieron 42% de desarrollo embrionario. Lindner *et al.*, (1983) también buscaron determinar la efectividad del almacenamiento de embriones a 4°C y el tiempo óptimo al cual se mantuviera la viabilidad de estos. Almacenando embriones de bovino durante 48h y cultivando a 37°C, obtuvieron una tasa de supervivencia similar a la de los embriones frescos. De hecho, después de 24h en frío no hubo diferencias en la supervivencia *in vitro* entre almacenados y frescos. En cambio, en nuestro estudio, la diferencia de desarrollo *in vitro* de aquellos embriones almacenados en frío durante 24h y los embriones frescos fue magnánima y estadísticamente significativa (23,5% frente a 93,8%).

Aún en estudios recientes, el almacenamiento a corto plazo se hace presente y no llega a ser un método obsoleto. Sakurai *et al.* (2005), utilizando embriones de ratón recién fertilizados, aunque con un protocolo diferente de ambientación al frío y de cultivo, almacenaron a 4°C siendo 12h de almacenamiento insuficientes para diferenciarlos respecto a los embriones frescos; pero sí la refrigeración durante 24 y 48h, este comportamiento persiste en la mayoría de estudios, mostrando constante diferencia entre embriones almacenados en frío por más de 24h y embriones frescos tal y como se observa en nuestro estudio, ya que nunca fueron estadísticamente iguales durante el cultivo *in vitro*. Sin ser almacenamiento a baja temperatura, Martínez *et al.* (2014) aplicaron el almacenamiento a corto plazo en *morulae* de porcino durante 24h a 37°C en un medio de pH estable sin gases de CO<sub>2</sub> logrando un 95% de desarrollo a blastocisto y presentando un retraso en el desarrollo comparado a embriones no tratados. Sin embargo, es justo lo que se busca: evitar que lleguen a blastocisto eclosionado durante el tiempo de transporte, que en este caso serían 24h, tiempo suficiente para cruzar el país e incluso viajar a otro en estado líquido, sin necesidad de congelar. Martínez *et al.* (2018) buscaron alargar el almacenamiento a baja temperatura hasta las 72h en un medio semi-definido con 0,4% de BSA logrando mantener la viabilidad *in vitro*. No obstante, a pesar de manifestar un retraso en el desarrollo, a las 72h muchos de los blastocistos habían eclosionado, lo cual hace su transporte no factible. Lo importante con el método de almacenamiento a corto plazo es que mantenga los embriones viables y retrase su desarrollo el mayor tiempo posible para permitir el transporte (Martínez *et al.* 2019).

Ge *et al.* (2019) trabajaron con embriones de ratón (en estadio de 8 células) refrigerados tras su recuperación durante 24, 48 y 72h en medio KSOM+BSA, que posteriormente se cultivaron bajo las mismas condiciones de cultivo aplicadas en el presente estudio. Mostrando tasas altas de desarrollo a blastocisto, en embriones refrigerados durante 24h: después de 29h de CIV (93,3%), estas fueron más alentadoras que las nuestras después de 72h de CIV (29,9%). En los grupos refrigerados durante 48 y 72h las tasas de desarrollo *in vitro* (63,5% y 6,3% respectivamente), Ge *et al.* (2019) fueron inferiores mostrando diferencias significativas entre sí, tal y como sucede en nuestro experimento (29,9% y 0,9%). El presente estudio, con tasas de desarrollo a blastocisto menores que el de Ge *et al.* (2019), comparte el mismo comportamiento: la supervivencia decreció a medida aumentó el tiempo de refrigeración previa al CIV.

El método convencional de congelación ha servido para producir lechones exitosamente (Nagashima *et al.*, 1994) (Kashiwazaki, 1991), aunque estos suelen tener una baja tasa de supervivencia después del descongelamiento (30%) (Nagashima *et al.*, 1994). Por otro lado, la efectividad de la vitrificación ha sido demostrada en diversos estudios con muchas especies, como en porcino donde ha logrado alcanzar una tasa de supervivencia de 85% en

estadio blastocisto con embriones delipados (Du *et al.*, 2006). Y se ha demostrado que los embriones porcinos producidos y madurados *in vitro* pueden ser vitrificados exitosamente con tasas de supervivencia del 60% (Ushimijima *et al.*, 2004) y 70% (Esaki *et al.*, 2004) utilizando el método de mínimo volumen junto con delipación.

En conejo, tras varios estudios, se ha demostrado que la vitrificación ha sido eficiente, mostrando tasas de supervivencia al nacimiento entre 25% y 65% (Kasai *et al.*, 1992; Vicente and Garcia-Ximenez 1994; Vicente *et al.*, 1999; López-Béjar and López-Gatius 2002; Mocé *et al.*, 2010; Marco-Jiménez *et al.*, 2013; Lavara *et al.*, 2014). En el presente estudio la supervivencia *in vitro* de los pronúcleos vitrificados de conejo no reportó un éxito similar, con tasas de supervivencia de 12.9% a las 24h de CIV y 7.9% a las 72h. En la actualidad, la vitrificación se realiza también en embriones humanos. Este método permite almacenar y descongelar óvulos y embriones causando menores daños que el enfriamiento y congelamiento lento, aun así, dando altas tasas de supervivencia (Nagy *et al.*, 2020). Liebermann (2009) data tasas de supervivencia en blastocistos de humano altas (96,3%) tras pasar por vitrificación. Según la bibliografía consultada, la vitrificación mejora considerablemente el almacenamiento de embriones con respecto a la congelación convencional, en un rango muy amplio (30-93%) e incluso superando el congelamiento lento (~60%) con eficiencias de 78-100% (Rienzi *et al.*, 2017).

En la mayoría de estos estudios, se almacenan embriones en estadio de blastocisto, a pesar de la gran variabilidad en la criotolerancia de los embriones en ciertas etapas de desarrollo (Nagashima *et al.*, 1992; Nagashima *et al.*, 1994a). Si bien se han logrado muchos avances en la criopreservación de embriones, en sus diferentes etapas de desarrollo, también las etapas tempranas han sido objeto de investigación para este método de almacenamiento. Desde 1971, se han publicado numerosos estudios investigando la criopreservación de ovocitos en algunas especies (Mullen, 2007), pero solo se han obtenido descendientes vivos en especies como el ratón (Whittingham, 1977), humano (Chen, 1986), conejo (Al-Hasani *et al.*, 1989), bovino (Fuku *et al.*, 1992), rata (Nakagata, 1992), caballo (Hochi *et al.*, 1994) y gato (Gómez *et al.*, 2008). El primer nacimiento exitoso de un ovocito criopreservado (por congelación lenta), realizado en ratones, fue obtenido por Whittingham (1977) en los 70's. Los primeros en obtener descendencia viva de conejo con el mismo método fueron Al-Hasani *et al.* (1989) y Vincent *et al.* (1989) quienes alcanzaron tasas de 7,5% y 8,6% respectivamente, al día 25 de gestación. En conejo se han realizados pocos trabajos (Al-Hasani *et al.*, 1989; Cai *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2010; Jiménez-Trigos *et al.*, 2012; Jiménez-Trigos *et al.*, 2013c) y solo dos recientes compararon los métodos de congelación lenta y vitrificación (Salvetti *et al.*, 2010; Jiménez-Trigos *et al.*, 2012).

Los ovocitos de conejo no son tan sensibles a las bajas temperaturas, el mayor inconveniente cuando se someten a criopreservación es la sensibilidad a los altos niveles de crioprotectores. Se ha demostrado que esto tiene un efecto contundente en la configuración del huso meiótico (Cai *et al.*, 2005; Salvetti *et al.*, 2010; Jiménez-Trigos *et al.*, 2013b), induciendo anomalías cromosómicas (Jiménez-Trigos *et al.*, 2013b). Por esto el desarrollo hasta blastocisto después de la descongelación de los ovocitos es tan bajo (Al-Hasani *et al.*, 1989; Salvetti *et al.*, 2010; Jiménez-Trigos *et al.*, 2012; Jiménez-Trigos *et al.*, 2013b; Jiménez-Trigos *et al.*, 2013c). En el presente estudio se optó por vitrificar embriones tempranos (pronúcleos). Las altas pérdidas embrionarias que se observaron en los resultados (Tabla 2) pudieron haber sido ocasionadas por el uso de los crioprotectores más que por el proceso mismo de la vitrificación. En los resultados obtenidos por Jiménez-Trigos *et al.* (2014) solo alrededor del 18% al 33% de los ovocitos criopreservados presentaron núcleos intactos después de la desvitrificación. En el grupo vitrificados (Tabla 2), tras la primera evaluación dentro de CIV (24h después de desvitrificación) la tasa de desarrollo fue solo de 12,9%. La tasa de supervivencia *in vitro* al final del cultivo resultó muy baja (7,9%) comparada al grupo control (93,8%) y los grupos Cold24 (23,5%) y Cold48 (29,9%), y probablemente habría decrecido aún más tras una transferencia, al punto de no generar nacidos vivos en caso de un ensayo posterior *in vivo*.

En experimentos *in vivo*, Jiménez-Trigos *et al.* (2013a) han sido los primeros en registrar nacidos vivos a partir de ovocitos vitrificados de conejo utilizando la transferencia intraoviductal como método para inducir la preñez. La eficiencia de la fertilización *in vivo* después de la transferencia que realizaron estos autores (5,5%) fue similar a la obtenida con ovocitos de congelación lenta (4,4%) y también a las tasas de nacidos vivos por congelación lenta (7,5%) que obtuvieron Al-Hasani *et al.* (1989). Jiménez-Trigos *et al.* (2013a) sugieren que el ambiente *in vivo* podría mejorar los resultados de la criopreservación de ovocitos de conejo ya que su estudio fue el primero que resultó en el desarrollo a término de los ovocitos vitrificados combinado con la fertilización *in vivo*.

Tanto a corto como largo plazo, ambos métodos son efectivos en el conejo, y se prestan para almacenar grandes cantidades de embriones. La vitrificación sigue siendo más costosa y el almacenamiento a corto plazo o baja temperatura, más práctico. El método será entonces seleccionado para adaptarse a los objetivos deseados. Si los embriones tienen alto valor genético y su transferencia no es urgente será mejor almacenar a largo plazo. Por otro lado, si la transferencia es necesaria a la mayor brevedad y tiene como destino otra región del país (u otro país) almacenarlo en líquido a baja temperatura será suficiente, menos dañino fisiológicamente y más rentable.

## 6. CONCLUSIÓN

Los tiempos óptimos de almacenamiento a corto plazo en embriones pronucleares de conejo fueron 24 y 48h, lo cual permitiría el transporte de estos a nivel nacional e internacional.

A medida que aumentó el tiempo de almacenamiento a corto plazo, el porcentaje de desarrollo *in vitro* decreció, siendo casi nulo cuando se almacenaron durante 72h. El almacenamiento a largo plazo fue altamente perjudicial para los pronúcleos de conejo, disminuyendo su desarrollo. Por ende, este tipo de almacenamiento no es recomendable para esta etapa embrionaria en el conejo.

## 7. REFERENCIAS

- AbdelHafez, F., Xu, J., Goldberg, J., & Desai, N. (2011). Vitrification in open and closed carriers at different cell stages: assessment of embryo survival, development, DNA integrity and stability during vapor phase storage for transport. *BMC biotechnology*, 11(1), 29.
- 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.
- Anderson, G. B., & Foote, R. H. (1975). Development of rabbit embryos after storage at 10 C. *Journal of Animal Science*, 40(5), 900-904.
- Anon. (2010). Sixth Report on the Statistics on the Number of Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes in the Member States of the European Union. SEC (2010) 1107.
- Arav, A. (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 81(1), 96-102.
- Averill, R. L. W. (1956). The transfer and storage of sheep ova. In *Proceedings of the 3rd International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Cambridge* (Vol. 3, pp. 7-9).
- Bajo Arenas, J. M., & Coloreu Lletget, B. (2009). Fundamentos de Reproducción. Editorial Medica Panamericana. Recuperado 9 de enero de 2020 de <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=YHQuuaXdTisC&oi=fnd&pg=PA24&dq=Fundamentos+de+reproducción.+Ed.+Médica+Panamericana.&ots=6e5jsfv4u6&sig=zdPNAESv3bh3hPw6PBJ7FdKufvY#v=onepage&q=criopreservación&f=false>
- Belzer, U. W. (2019). Cold Storage Solution (University of Wisconsin), Bridge to Life. 2017.
- BonDurant, R. H., Anderson, C. B., Boland, M. P., Cupps, P. T., & Hughes, M. A. (1982). Preliminary studies on bovine embryo survival following short-term storage at 4° C. *Theriogenology*, 17(2), 223-230.
- Cai, X. Y., Chen, G. A., Lian, Y., Zheng, X. Y., & Peng, H. M. (2005). Cryoloop vitrification of rabbit oocytes. *Human Reproduction*, 20(7), 1969–1974. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh805>

- Carney, N. J., Squires, E. L., Cook, V. M., Seidel Jr, G. E., & Jasko, D. J. (1991). Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. *Theriogenology*, 36(1), 23-32.
- Celestinos, M., & Gatica, R. (2002). Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation. *Arch. med. vet*, 34(2), 157-165.
- Chang, M. C. (1947). Normal development of fertilized rabbit ova stored at low temperature for several days. *Nature*, 159(4044), 602.
- Chang, M. C. (1948). Transplantation of fertilized rabbit ova: the effect on viability of age, in vitro storage period, and storage temperature. *Nature*, 161(4103), 978.
- Chen, C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *The Lancet*, 327(8486), 884-886.
- de Dios Hourcade, J., Pérez-Crespo, M., Serrano, A., Gutiérrez-Adán, A., & Pintado, B. (2012). In vitro and in vivo development of mice morulae after storage in non-frozen conditions. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 10(1), 62.
- Desai, N., Szeptycki, J., Scott, M., AbdelHafez, F. F., & Goldfarb, J. (2008). Artificial collapse of blastocysts before vitrification: mechanical vs. laser technique and effect on survival, cell number, and cell death in early and expanded blastocysts. *Cell Preservation Technology*, 6(3), 181-190.
- Diaz, F. A., Gutierrez, E. J., Cramer, E., Paccamonti, D. L., Gentry, G. T., & Bondioli, K. R. (2018). Pregnancy Rates Following Low-Temperature Storage of Large Equine Embryos Before Vitrification. *Journal of equine veterinary science*, 64, 12-16.
- Dobrinsky, J. R. (1996). Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45(1), 17-26.
- Dobrinsky, J. R. (1997). Cryopreservation of pig embryos. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 52, 301-312.
- Dobrinsky, J. R. (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57(1), 285-302.
- Douchi, O., Takakura, H., & Imai, K. (1990). Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrification. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 36(1), 69-72.

- Du, Y., Kragh, P. M., Zhang, X., Yang, H., Vajta, G., & Bolund, L. (2006). 90 SUCCESSFUL VITRIFICATION OF PARTHENOGENETIC PORCINE BLASTOCYSTS PRODUCED FROM DELIPATED IN VITRO-MATURED OOCYTES. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(2), 153-153.
- El-Gayar, M., & Holtz, W. (2001). Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *Journal of animal science*, 79(9), 2436-2438.
- Esaki, R., Ueda, H., Kurome, M., Hirakawa, K., Tomii, R., Yoshioka, H., ... & Nagashima, H. (2004). Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biology of reproduction*, 71(2), 432-437.
- Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A., & Meryman, H. T. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21(4), 407-426.
- Fahy, G. M., Wowk, B., Wu, J., & Paynter, S. (2004). Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology*, 48(1), 22-35.
- Fischer, B., Chavatte-Palmer, P., Viebahn, C., Navarrete Santos, A., & Duranthon, V. (2012). Rabbit as a reproductive model for human health. *Reproduction*, 144(1), 1.
- Fuku, E., Kojima, T., Shioya, Y., Marcus, G. J., & Downey, B. R. (1992). In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, 29(4), 485-492. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90051-3)
- Garcia-Dominguez, X., Marco-Jiménez, F., Puigcerver-Barber, M., Mas-Pellicer, A., & Vicente, J. S. (2020). The harmful effect of removing the extracellular vitrification medium during embryo cryopreservation using a nylon mesh device in rabbit. *Cryobiology*, 93, 44-48.
- Garcia-Dominguez, X., Marco-Jimenez, F., Viudes-de-Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2019). Minimally invasive embryo transfer and embryo vitrification at the optimal embryo stage in rabbit model. *Jove (Journal of Visualized Experiments)*, (147), e58055.
- Garcia-Dominguez, X., Vicente, J. S., & Marco-Jiménez, F. (2020). Developmental Plasticity in Response to Embryo Cryopreservation: The Importance of the Vitrification Device in Rabbits. *Animals*, 10(5), 804.
- Gastal, G. D. A., Scarlet, D., Ertl, R., & Aurich, C. (2018). 85 Influence of Short-Term Storage on Gene Expression of Equine Embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(1), 182-182.

- Ge, L., Yang, S., Liang, H., Liu, X., Liu, W., Ding, Y., ... & Liu, Z. (2019). Production of F0 mice from embryonic stem cells injected eight-cell stage embryos which stored at refrigeration temperature. *Cryobiology*, 86, 89-94.
- Gómez, M. C., Kagawa, N., Pope, C. E., Kuwayama, M., Leibo, S. P., & Dresser, B. L. (2008). 74 IN VIVO SURVIVAL OF DOMESTIC CAT OOCYTES AFTER VITRIFICATION, INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION, AND TRANSFER TO RECIPIENTS. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(1), 118. <https://doi.org/10.1071/rdv20n1ab74>
- Grau, N., Aparicio, B., Escrich, L., Mercader, A., Delgado, A., Remohí, J., & Escribá, M. J. (2013). Short-term storage of tripronucleated human embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(8), 1043-1047.
- Graur, D., Duret, L., & Gouy, M. (1996). Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares, and allies). *Nature*, 379(6563), 333-335.
- Hafez, E. S. (1963). Storage of fertilized ova. *International journal of fertility*, 8, 459-466.
- Hafez, E. S. E. (1965). Storage media for rabbit ova. *Journal of applied physiology*, 20(4), 731-736.
- Harper, M. J. K., & Rowson, L. E. A. (1963). Attempted storage of sheep ova at 7 centigrade. *Reproduction*, 6(2), 183-191.
- Herr, C. M., & Wright Jr, R. W. (1988). Cold storage of mouse embryos of different stages of development. *Theriogenology*, 29(3), 765-770.
- Hochi, S., Fujimoto, T., Braun, J., & Oguri, N. (1994). Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology*, 42(3), 483-488. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90686-D](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90686-D)
- Hochi, S., Terao, T., Kamei, M., Kato, M., Hirabayashi, M., & Hirao, M. (2004). Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology*, 61(2-3), 267-275.
- Hughes, M. A., & Anderson, G. B. (1982). Short-term storage of rabbit embryos at 4 C. *Theriogenology*, 18(3), 275-282.
- Ideta, A., Aoyagi, Y., Tsuchiya, K., Kamijima, T., Nishimiya, Y., & Tsuda, S. (2013). A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4 C. *Scientific reports*, 3(1), 1-5.

- Ideta, A., Aoyagi, Y., Tsuchiya, K., Nakamura, Y., Hayama, K., Shirasawa, A., ... & Tsuda, S. (2014). Prolonging hypothermic storage (4 C) of bovine embryos with fish antifreeze protein. *Journal of Reproduction and Development*.
- Ishimori, H., Saeki, K., Inai, M., Nagao, Y., Itasaka, J., Miki, Y., ... & Kainuma, H. (1993). Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, 40(2), 427-433.
- Ishimori, H., Takahashi, Y., & Kanagawa, H. (1992). Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Theriogenology*, 37(2), 481-487.
- Jiménez-Trigos, E., Naturil-Alfonso, C., Vicente, J., & Marco-Jiménez, F. (2012). Effects of Cryopreservation on the Meiotic Spindle, Cortical Granule Distribution and Development of Rabbit Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(3), 472–478. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01906.x>
- Jiménez-Trigos, E., Naturil-Alfonso, C., Vicente, J., & Marco-Jiménez, F. (2013). Post-Warming Competence of In Vivo Matured Rabbit Oocytes Treated with Cytoskeletal Stabilization (Taxol) and Cytoskeletal Relaxant (Cytochalasin B) Before Vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(1), 15–19. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02018.x>
- Jiménez-Trigos, E., Vicente, J. S., & Marco-Jiménez, F. (2013). Live birth from slow-frozen rabbit oocytes after in vivo fertilisation. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083399>
- Jiménez-Trigos, E., Vicente, J. S., & Marco-Jiménez, F. (2014). First pregnancy and live birth from vitrified rabbit oocytes after intraoviductal transfer and in vivo fertilization. *Theriogenology*, 82(4), 599–604. <https://doi.org/10.1016/j.Theriogenology.2014.05.029>
- Jiménez-Trigos, E., Vicente, J. S., Mocé, E., Naturil-Alfonso, C., Fernandez-Gonzalez, R., Gutierrez-Adan, A., & Marco-Jiménez, F. (2013). Treatment with cholesterol-loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin increased the cholesterol in rabbit oocytes, but did not improve developmental competence of cryopreserved oocytes. *Cryobiology*, 67(1), 106–108. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.006>
- Kardymowicz, O. (1962). Storage of fertilized rabbit ova. *Nature*, 193(4814), 486-487.
- Kardymowicz, M., Kardymowicz, O., & Grochowalski, K. (1966). A STUDY ON EFFECT OF COOLING OF SHEEP OVA TO 10 DEGREES C ON THEIR CAPABILITY OF

FUTHER DEVELOPMENT. *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA SERIES ZOOLOGIA*, 9(1), 113.

Kardymowicz, M., Kardymowicz, O., & Kremer, M. (1966). Successful in vitro storage of sheep ova for 5 days. *ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA SERIES ZOOLOGIA*, 9(1), 117.

Kardymowicz, M., Kardymowicz, O., Kuhl, W., & Lada, A. (1963). Storage of fertilized sheep ova at low temperature. *Acta. biol. cracov., Zool*, 6, 31.

Kasai, M. (1986). Nonfreezing technique for short-term storage of mouse embryos. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 3(1), 10-14.

Kasai, M. (1996). Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 67-75.

Kasai, M., & Mukaida, T. (2004). Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, 9(2), 164-170.

Kasai, M., Hamaguchi, Y., Zhu, S. E., Miyake, T., Sakurai, T., & Machida, T. (1992). High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biology of reproduction*, 46(6), 1042-1046.

Kasai, M., Niwa, K., & Iritani, A. (1983). Protective effect of sucrose on the survival of mouse and rat embryos stored at 0 C. *Reproduction*, 68(2), 377-380.

Kashiwazaki, N. (1991). Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. *Vet. Rec.*, 128, 256-257.

Kidder, J. D., Roberts, P. J., Simkin, M. E., Foote, R. H., & Richmond, M. E. (1999). Nonsurgical collection and nonsurgical transfer of preimplantation embryos in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Reproduction*, 116(2), 235-242.

Konc, J., Kanyó, K., Kriston, R., Somoskői, B., & Cseh, S. (2014). Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *BioMed research international*, 2014.

Kopeika, J., Thornhill, A., & Khalaf, Y. (2014). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of Cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human reproduction update*, 21(2), 209-227.

- Kuleshova, L. L., Macfarlane, D. R., Trounson, A. O., & Shaw, J. M. (1999). Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, 38(2), 119-130.
- Kuwayama, M., & Kato, O. (2000). Successful vitrification of human oocytes. *Fertility and sterility*, 74(3), S49.
- Kuwayama, M., Hamano, S., & Nagai, T. (1992). Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *Reproduction*, 96(1), 187-193.
- Kuwayama, M., Holm, P., Jacobsen, H., Greve, T., & Callesen, H. (1997). Successful cryopreservation of porcine embryos by vitrification.
- Lavara, R., Baselga, M., Marco-Jiménez, F., & Vicente, J. S. (2014). Long-term and transgenerational effects of cryopreservation on rabbit embryos. *Theriogenology*, 81(7), 988-992.
- Leeuw, A. V. W. D., Daas, J. D., & Rall, W. F. (1994). Pregnancy rates in a comparative field trial of vitrificación and one-step dilution or conventional slow freezing and three-step dilution of bovine embryos are similar. *Theriogenology*, 41(1), 326-326.
- Leibo, S. P. (2008). Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, 69(1), 37-47.
- Leibo, S. P., & Songsasen, N. (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57(1), 303-326.
- Liebermann, J. (2009). Vitrification of human blastocysts: an update. *Reproductive BioMedicine Online*, 19, 105-114.
- Lindner, G. M., Anderson, G. B., BonDurant, R. H., & Cupps, P. T. (1983). Survival of bovine embryos stored at 4 C. *Theriogenology*, 20(3), 311-319.
- Lopez-Bejar, M., & Lopez-Gatius, F. (2002). Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology*, 58(8), 1541-1552.
- Mapara, M., Thomas, B. S., & Bhat, K. M. (2012). Rabbit as an animal model for experimental research. *Dental research journal*, 9(1), 111.

- Marco-Jiménez, F., Jiménez-Trigos, E., Almela-Miralles, V., & Vicente, J. S. (2016). Development of cheaper embryo vitrification device using the minimum volume method. *PLOS one*, *11*(2), e0148661.
- Marco-Jiménez, F., Lavara, R., Jiménez-Trigos, E., & Vicente, J. S. (2013). In vivo development of vitrified rabbit embryos: effects of vitrification device, recipient genotype, and asynchrony. *Theriogenology*, *79*(7), 1124-1129.
- Martinez, C. A., Cambra, J. M., Nohalez, A., Parrilla, I., Roca, J., Vazquez, J. L., ... & Cuello, C. (2019). Prevention of hatching of porcine morulae and blastocysts by liquid storage at 20° C. *Scientific reports*, *9*(1), 6219.
- Martinez, C. A., Nohalez, A., Parrilla, I., Lucas, X., Sanchez-Osorio, J., Roca, J., ... & Gil, M. A. (2018). Simple storage (CO<sub>2</sub>-free) of porcine morulae for up to three days maintains the in vitro viability and developmental competence. *Theriogenology*, *108*, 229-238.
- Martinez, E. A., Angel, M. A., Cuello, C., Sanchez-Osorio, J., Gomis, J., Parrilla, I., ... & Vazquez, J. L. (2014). Successful non-surgical deep uterine transfer of porcine morulae after 24 hour culture in a chemically defined medium. *PLoS One*, *9*(8), e104696.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, *247*(3), C125-C142.
- Mazur, P. (2010). A biologist's view of the relevance of thermodynamics and physical chemistry to Cryobiology. *Cryobiology*, *60*(1), 4-10.
- McCue, P. M. (2014). Embryo Packaging for Cooled Transport. *Equine Reproductive Procedures*, *175*.
- Medicine, A. S. I. R. (2012). The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting. *Reproductive BioMedicine Online*, *25*(2), 146-167.
- Men, H., Agca, Y., Critser, E. S., & Critser, J. K. (2005). Beneficial effects of serum supplementation during in vitro production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. *Theriogenology*, *64*(6), 1340-1349.
- Ménézo, Y. J., & Hérubel, F. (2002). Mouse and bovine models for human IVF. *Reproductive BioMedicine Online*, *4*(2), 170-175.

- Miyake, T., Kasai, M., Zhu, S. E., Sakurai, T., & Machida, T. (1993). Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology*, *40*(1), 121-134.
- Miyoshi, I., Ishikawa, K., Kasai, M., & Kasai, N. (1992). Useful short-range transport of mouse embryos by means of a nonfreezing technique. *Laboratory animal science*, *42*(2), 198-201.
- Mocé, M. L., Blasco, A., & Santacreu, M. A. (2010). In vivo development of vitrified rabbit embryos: Effects on prenatal survival and placental development. *Theriogenology*, *73*(5), 704-710.
- Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R., Grupen, C., Seamark, R. F., & Nottle, M. (1994). Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology*, *41*(1), 113-118.
- Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R. J., Grupen, C. G., Seamark, R. F., & Nottle, M. B. (1994). Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biology of reproduction*, *51*(4), 618-622.
- Nagashima, H., Yamakawa, H., & Niemann, H. (1992). Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology*, *37*(4), 839-850.
- Nagy, Z. P., Shapiro, D., & Chang, C. C. (2020). Vitrification of the human embryo: a more efficient and safer in vitro fertilization treatment. *Fertility and sterility*, *113*(2), 241-247.
- Nakamura, K. (1986). Investigation on the low temperature resistance of mouse pronuclei by using nuclear transplantation technique. *Jan J Anim Reprod*, *32*, 134-137.
- Nakamura, K., & Tsunoda, Y. (1992). Viability of nuclei of two-cell mouse embryos stored at 4 C and fused with blastomeres of fresh two-cell embryos. *Cryobiology*, *29*(4), 493-499.
- Niimura, S., & Ishida, K. (1980). Histochemical observations of lipid droplets in mammalian eggs during the early development. *Japanese Journal of Animal Reproduction*.
- Nishijima, K., Liu, E., Yamaguchi, S., Tanaka, M., Morimoto, M., Watanabe, T., ... & Kitajima, S. (2013). Delaying embryo development by storing at 4 C for synchronization to recipients in microinjection technique in rabbits. *Laboratory animals*, *47*(1), 53-57.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Horikita, N., Tachikawa, S., & Suzuki, T. (1999). Relationship between dead cells and DNA fragmentation in bovine embryos produced in vitro and stored at

4 C. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 54(4), 342-347.

- Papis, K., Korwin-Kossakowski, M., & Wenta-Muchalska, E. (2009). Comparison of traditional and modified (VitMaster) methods of rabbit embryo vitrification. *Acta Veterinaria Hungarica*, 57(3), 411-416.
- Polge, C. (1977). The freezing of mammalian embryos: perspectives and possibilities. *The freezing of mammalian embryos*, 52, 3-12.
- Rall, W. F., Mazur, P. E. T. E. R., & McGrath, J. J. (1983). Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide. *Biophysical journal*, 41(1), 1-12.
- Rice, F. O. (1960). History of radical trapping. Formation and trapping of free radicals. *New York: Academic*, 7.
- Rienzi, L., Gracia, C., Maggiulli, R., LaBarbera, A. R., Kaser, D. J., Ubaldi, F. M., ... & Racowsky, C. (2017). Oocyte, embryo, and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Human reproduction update*, 23(2), 139-155.
- Saenz-de-Juano, M. D., Marco-Jimenez, F., Viudes-de-Castro, M. P., Lavara, R., & Vicente, J. S. (2014). Direct comparison of the effects of slow freezing and vitrification on late blastocyst gene expression, development, implantation, and offspring of rabbit morulae. *Reproduction in domestic animals*, 49(3), 505-511.
- Saha, S., Otoi, T., Takagi, M., Boediono, A., Sumantri, C., & Suzuki, T. (1996). Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*, 33(3), 291-299.
- Sakurai, T., Kimura, M., & Sato, M. (2005). Temporary developmental arrest after storage of fertilized mouse oocytes at 4 C: effects on embryonic development, maternal mRNA processing and cell cycle. *Molecular human reproduction*, 11(5), 325-333.
- Salveti, P., Buff, S., Afanassieff, M., Daniel, N., Guérin, P., & Joly, T. (2010). Structural, metabolic and developmental evaluation of ovulated rabbit oocytes before and after cryopreservation by vitrification and slow freezing. *Theriogenology*, 74(5), 847-855. <https://doi.org/10.1016/j.Theriogenology.2010.04.009>

- Saragusty, J., & Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141(1), 1-19.
- Sertich, P. L., Love, L. B., Hodgson, M. R., & Kenney, R. M. (1988). 24-hour cooled storage of equine embryos. *Theriogenology*, 30(5), 947-952.
- Sherman, J. K., & Lin, T. P. (1959). Temperature shock and cold-storage of unfertilized mouse eggs. *Fertility and sterility*, 10(4), 384-396.
- Smorag, Z., Gajda, B., Wieczorek, B., & Jura, J. (1989). Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 31(6), 1227-1231.
- Sommerfeld, V., & Niemann, H. (1999). Cryopreservation of bovine in Vitro Produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 38(2), 95-105.
- Takeo, T., Kondo, T., Haruguchi, Y., Fukumoto, K., Nakagawa, Y., Takeshita, Y., ... & Goto, M. (2010). Short-term storage and transport at cold temperatures of 2-cell mouse embryos produced by cryopreserved sperm. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 49(4), 415-419
- Trounson, A. O., Willadsen, S. M., Rowson, L. E. A., & Newcomb, R. (1976). The storage of cow eggs at room temperature and at low temperatures. *Reproduction*, 46(1), 173-178.
- Tsuchiya, H., Ogonuki, N., Kuwana, T., SANKAI, T., & KANAYAMA, K. (2001). Short-term preservation of mouse oocytes at 5 C. *Experimental animals*, 50(5), 441-443.
- Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 60, 357-364.
- Vajta, G., & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65(1), 236-244.
- Vicente, J. S., & Garcia-Ximenez, F. (1994). Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. *Theriogenology*, 42(7), 1205-1215.
- Vicente, J. S., & Garcia-Ximenez, F. (1996). Direct transfer of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 45(4), 811-815.
- Vicente, J. S., Lavara, R., Marco-Jiménez, F., & Viudes-de-Castro, M. P. (2011). Detrimental effect on availability of busarelin acetate administered in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76(6), 1120-1125.

- Vicente, J. S., Viudes-De-Castro, M. P., & García, M. L. (1999). In vivo survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein. *Reproduction Nutrition Development*, 39(5-6), 657-662.
- Vincent, C., Garnier, V., Heyman, Y., & Renard, J. P. (1989). Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87(2), 809–820. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0870809>
- Wales, R. G. (1969). Accumulation of carboxylic acids from glucose by the pre-implantation mouse embryo. *Australian journal of biological sciences*, 22(3), 701-708.
- Whittingham, D. G. (1977). Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49(1), 89–94. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0490089>
- Whittingham, D. G., & Adams, C. E. (1976). Low temperature preservation of rabbit embryos. *Reproduction*, 47(2), 269-274.
- Whittingham, D. G., & Wales, R. G. (1969). Storage of two-cell mouse embryos in vitro. *Australian Journal of Biological Sciences*, 22(4), 1065-1068.
- Wiggins, P. M., & Ferguson, A. B. (1999). U.S. Patent No. 5,879,875. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Wiggins, P. M., Rowlandson, J., & Ferguson, A. B. (1999). Preservation of murine embryos in a state of dormancy at 4° C. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 276(2), C291-C299.
- Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., & Critser, J. K. (2004). Fundamental Cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48(2), 146-156.