



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Eficiencia de un medio vitrificación con ficoll y trealosa
sobre la viabilidad de embriones de conejo.

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Knetter Roche, Cristina

Tutor/a: Vicente Antón, José Salvador

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA Y DEL MEDI NATURAL

----Trabajo Fin de Grado en Biotecnología----

**Eficiencia de un medio de vitrificación con ficoll y
trehalosa sobre la viabilidad de embriones de conejo**

Alumna: Cristina Knetter Roche

Tutor: José Salvador Vicente Antón

Curso académico: 22/23

Valencia, Julio 2023



Título: Eficiencia de un medio de vitrificación con ficoll y trehalosa sobre la viabilidad de embriones de conejo

Autora: Dña. Cristina Knetter Roche

Tutor: Prof. D. José Salvador Vicente Antón

Valencia, Julio 2023

RESUMEN

Una de las limitaciones de la crioconservación embrionaria es el hecho de que embriones de una misma especie muestran diferente criotolerancia dependiendo de cuál sea su estadio de desarrollo. En la mayor parte de las especies en las que se utilizan las técnicas de crioconservación se ha observado que el ratio de supervivencia de embriones desde el estadio pronuclear al de 8-16 células es menor al alcanzado en estadios mórula compacta o blastocisto. Estos estadios, al igual que los óvulos, muestran una gran sensibilidad al enfriamiento y a los crioprotectores por lo que a partir de los procedimientos clásicos de congelación se han desarrollado protocolos de vitrificación que incrementan la velocidad de enfriamiento.

Este estudio pretende definir un medio de baja toxicidad, basado en dimetilsulfóxido (DMSO), etanol (EtOH), ficoll y trehalosa, que consiga mejorar la viabilidad de estos estadios tras la vitrificación, evaluando la viabilidad de 3 estadios embrionarios diferentes de alcanzar el desarrollo a blastocisto. Por ello se diseñaron dos ensayos de viabilidad embrionaria *in vitro*, el primero para comprobar la toxicidad del medio y el segundo para evaluar la respuesta al proceso de vitrificación-desvitrificación.

Los embriones fueron obtenidos de hembras sometidas a un tratamiento de superovulación con coriofolitropina alfa, administrada en una única dosis de 0,5ml 72 horas antes de la inseminación. Tras esta se obtuvieron los embriones en 3 estadios: 2 células a las 24 horas, 8-16 células a las 48 horas y mórulas a las 72 horas tras la inseminación. Los ensayos de toxicidad y viabilidad post-vitrificación se llevaron a cabo con dos medios distintos: el medio OLD a base de DMSO y EtOH; (20%+20% v/v); y el medio NEW a base de 12% (v/v) DMSO, 20% (v/v) EtOH, 17% (p/v) Ficoll y 0,5M de trehalosa, empleando como soporte para la vitrificación el Cryotop. Tras la exposición a los medios y tras la desvitrificación se evaluó la capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocistos, a las 72 horas los de 2 células, a las 48 horas los de 8-16 células y a las 24 horas las mórulas.

El estudio de toxicidad demostró que la viabilidad del medio NEW fue similar a la del medio OLD empleado actualmente en la vitrificación (en torno al 80% de desarrollo a blastocisto) y que el estadio embrionario de 2 células era el más afectado reduciendo su tasa de desarrollo a blastocisto hasta el 68% cuando eran expuestos al medio OLD.

Post-desvitrificación, el medio NEW mejora la supervivencia de los embriones vitrificados, sobre todo los embriones de estadios tempranos (24 y 48 horas), alcanzando hasta un 37% de tasa de desarrollo a blastocisto en embriones de 2 células frente a tan solo un 10% con el medio OLD. Esta mejora en la viabilidad *in vitro* de los estadios embrionarios tempranos debe ser corroborada *in vivo* tras su transferencia a conejas receptoras.

Este trabajo contribuye a 2 de los objetivos de desarrollo sostenible (ODS): ODS 3, salud y bienestar y ODS 15, vida de ecosistemas terrestres. El desarrollo o la puesta a punto de herramientas de biotecnología reproductiva como la crioconservación ayuda a solventar los problemas reproductivos y la planificación familiar, por otro lado, esta tecnología facilita la conservación de recursos genéticos y con ello la preservación de la biodiversidad animal.

PALABRAS CLAVE

Embriones, Vitricación, Ficoll, Trehalosa, Viabilidad, Conejo

Title: Efficiency of a vitrification medium containing ficoll and trehalose in the viability of rabbit embryos

Author: Ms. Cristina Knetter Roche

Tutor: Prof. Mr. José Salvador Vicente Antón

Valencia, July 2023

ABSTRACT

One of the limitations of the cryopreservation of embryos is the fact that embryos of the same species demonstrate different tolerance to the cryopreservation depending on their state of development. In the majority of species where cryopreservation techniques are used, it has been observed that the survival rate of embryos from pronuclear to 8-16 cells is less than the survival seen in the states of compact morulae or blastocyst. These states, like that of the oocytes, show a significant sensibility to cooling and to the cryoprotectors, so starting from the classic freezing procedure new protocols of vitrification have been developed that increase the speed of freezing.

This project intends to define a medium of low toxicity, based on dimethylsulfoxide (DMSO), ethanol (EtOH), ficoll and trehalose, that succeeds in increasing the viability of these states after the vitrification, evaluating the viability of the 3 different embryonic states from initial development to blastocyst. This is why two *in vitro* embryo viability experiments were designed, the first to determine the toxicity of the medium and the second to evaluate the response of the process of vitrification-devitrification.

The embryos were obtained from females exposed to a superovulation treatment with coriofollitropin alpha, administered in a single dose of 0,5ml 72 hours before insemination. After this, the embryos were obtained in 3 states, 2 cells at 24 hours, 8-16 cells at 48 hours and morulae at 72 hours after insemination. The toxicity and viability experiments were executed in two different mediums: the OLD medium based on DMSO and EtOH (20%+20% v/v); and the NEW medium based on 12% (v/v) DMSO, 20% (v/v) EtOH, 17% (p/v) Ficoll and 0,5M of trehalose, using Cryotop as support for the vitrification. After the devitrification, the capability of development was observed until blastocyst, at 72 hours those with 2 cells, at 48 hours those with 8-16 cells and at 24 hours the morulae.

The toxicity experiment demonstrated that the viability of the NEW medium was similar to that of the OLD medium commonly used in vitrification (approximately 80% of development to blastocyst) and that the 2-cell embryo was the most affected reducing the development rates to 68% when they were exposed to the OLD medium.

Post-devitrification, the NEW medium improved the survival rate of the vitrified embryos in all the early stages embryos (24 and 48 hours), reaching a 37% development ratio in the 2-cell opposed to the 10% achieved with the OLD medium. This improvement of *in vitro* for the 2 early embrionic stages needs to be corroborated *in vivo* after the transference to female receptors.

This Project contributes to 2 of the objectives of sustainable development, ODS3, health and welfare and ODS 15, life of terrestrial ecosystems. The development or maintenance of biotechnology tools such as the cryoconservation, help solve reproductive problems and assist in family planning, on the other hand, this technology can also facilitate the preservation of genetic resources, leading to the preservation of animal biodiversity.

KEY WORDS

Embryos, Vitrification, Ficoll, Trehalose, Viability, Rabbit

AGRADECIMIENTOS

En la siguiente página van recogidos los agradecimientos a todas las personas que han ayudado a que este trabajo llegara a ser una realidad.

En primer lugar, quiero agradecer a José, el tutor de este trabajo, que me ha abierto las puertas de su laboratorio y me ha brindado la oportunidad de realizar con él mi TFG, aprender de sus conocimientos y transmitirme toda esa ilusión hacia el trabajo que estábamos realizando. Quería agradecerle por la ayuda, dedicación y paciencia que me ha mostrado. Y sobre todo por mostrarme de primera mano la satisfacción que da el trabajo que realizamos y por el que he luchado estos últimos cuatro años.

A Rubén con el que he compartido alegrías y penas estos últimos años en la carrera, hablando de clases, profesores y compañeros, sabiendo darnos fuerzas mutuamente y seguir adelante. Al final conseguimos acabar el año con nuestra beca y el TFG entregado, dispuestos a comernos el mundo mañana y lograr todas las demás metas que nos proponíamos.

A Miguel, el que me ha dado todo el cariño y amor que he necesitado cuando veía todo negro y me ha animado en esas interminables noches de estudio, ayudándome a creer en mí misma y en todo lo que puedo conseguir. Por todas las veces que me ha intentado ayudar con algún problema, aunque me haya estresado y no haya escuchado nada más (sorry). Eternamente agradecida de que me hayas hecho mi estancia en Valencia mucho más amena y mucho más bonita.

A Valencia, por ofrecerme la oportunidad de realizar aquí la carrera y crecer en muchos sentidos.

Y en último lugar, a las personas más importantes que tengo en la vida: a mi familia.

A Diego por enseñarme ese amor por la ciencia y darme a conocer esta carrera tan bonita que estoy acabando. Por venir a visitarme y sólo querer salir a recorrer las calles de Valencia para hacer fotos. Y por siempre ser el primero que se alegra de todos mis logros, aunque lo exprese a tu forma.

A Papá por ayudarme a solucionar todos mis problemas con el ordenador y cualquier otra cosa que necesitase arreglar, por siempre creer en mí y hacerme reír (aunque a veces sea de lo malo que es el chiste). Y porque siempre vaya a ser tu niña por muy mayor que me haga.

Y por último a Mamá, mi pilar fundamental, la que siempre está cuándo necesito un hombro sobre el que llorar (aunque sea por teléfono) o alguien con quien cotillear sobre lo que me ha pasado en el día. Por hacerme creer en mí y ayudarme a ser quien soy hoy en día y a mostrarme cómo soy. Porque sin ti nada de esto hubiera sido posible.

A mi Yaya, que a pesar de sus lagunas y la distancia no se ha olvidado de mí en estos 4 años y no ha dejado de animarme a cumplir mis metas.

Especial mención a mi Yayo, Grandpa y a mi primo Johnny que me han estado guiando estos años desde el cielo, animándome en todo el camino.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Técnicas de reproducción asistida.....	1
1.2. Fundamentos de vitrificación.....	2
1.3. Características de los crioprotectores y medios de vitrificación.....	4
1.4. Limitaciones de vitrificación.....	6
1.4.1. Estadios de desarrollo temprano.....	6
1.4.2. Embriones producidos in vitro.....	6
1.5. Avances de vitrificación.....	6
1.6. Vitrificación de embriones humanos.....	8
1.7. Vitrificación de embriones de conejo.....	8
2. Objetivos.....	11
3. Materiales y métodos.....	12
3.1. Diseño experimental.....	12
3.1.1. Experimento 1: Ensayo de la toxicidad de un nuevo medio de vitrificación de embriones de conejo en 3 estadios diferentes.....	12
3.1.2. Experimento 2: Ensayo de vitrificación de embriones de conejo en 3 estadios diferentes.....	13
3.2. Animales.....	13
3.3. Recuperación de embriones.....	14
3.3.1. Tratamiento de superovulación.....	14
3.3.2. Recogida de semen.....	14
3.3.3. Valoración del semen.....	15
3.3.4. Inseminación artificial.....	15
3.3.5. Inducción de ovulación.....	16
3.3.6. Obtención de embriones.....	16
3.3.7. Catalogación de embriones.....	17
3.4. Medio de vitrificación.....	17
3.5. Proceso de vitrificación de embriones.....	18
3.6. Desvitrificación.....	19
3.7. Cultivo de embriones.....	19
3.8. Valoración calidad embrionaria.....	19
3.9. Análisis estadístico.....	20
4. Resultados y discusión.....	21
4.1. Valoración de la toxicidad del medio de vitrificación.....	21
4.2. Valoración del desarrollo embrionario tras la vitrificación.....	23
5. Conclusión.....	25
6. Referencias.....	26

Índice abreviaturas

TRA: técnica de reproducción asistida
IA: inseminación artificial
FIV: fecundación in vitro
CPA: aditivos crioprotectores
DMSO: dimetilsulfóxido
EtOH: etanol
EG: etilenglicol
PG: propilenglicol
PVP: polivinilpirrolidona
OLD: medio a base de DMSO y EtOH
NEW: medio a base de DMSO, EtOH, ficoll y trehalosa
DPBS: tampón sulfato de Dulbecco
GnRH: hormona liberadora de gonadotropina
EQ: medio de equilibrio
VIT: medio de vitrificación
EGF: etilenglicol + ficoll

Índice figuras

Figura 1: Imagen comparación procesos: Proceso de congelación y vitrificación, antes del enfriamiento durante y una vez en nitrógeno líquido. Los hexágonos simbolizan la formación de cristales de hielo (Adaptada de Fahy y Rall, 2007).....	2
Figura 2: Soportes superficiales de vitrificación: (1) rejillas EM, (2) mínimo tamaño de gota, (3) Cryotop, (4) Cryoloop y (5) Hemi-straw. (Adaptada de Saragusty y Arav, 2011).....	7
Figura 3: Envases tubulares de vitrificación: (1) pajuelas de plástico, pajuelas estiradas abiertas (OPS), pajuelas estiradas abiertas superfinas (SOPS) y flexipet-denuding pipette; (2) Cryotip y (3) dispositivos de vitrificación de alta seguridad (Adaptada de Saragusty y Arav, 2011).....	8
Figura 4: Esquema del protocolo seguido para el desarrollo del experimento 1: Ensayo de la toxicidad de un nuevo medio de vitrificación de embriones de conejo en 3 estadios diferentes....	12
Figura 5: Esquema del protocolo seguido para el desarrollo del experimento 2: Ensayo de vitrificación de embriones en 3 estadios diferentes.....	13
Figura 6: Inyección subcutánea.....	14
Figura 7: Vagina artificial.....	15
Figura 8: Cánulas acodadas.....	16
Figura 9: Introducción del catéter en la inseminación artificial.....	16
Figura 10: Administración de GnRH.....	16
Figura 11: Perfusión del oviducto y cuerno uterino.....	17
Figura 12: 2 células (24h)	17
Figura 13: 8-16 células (48h).....	17
Figura 14: mórula (72h).....	17
Figura 15: Descripción del proceso de vitrificación.....	18
Figura 16: Cryotop.....	18
Figura 17: Descripción del proceso de desvitrificación.....	19
Figura 18: Blastocisto.....	20

Índice tablas

Tabla 1: ventajas de vitrificación (Extraída de Liebermann <i>et al.</i> , 2002).....	3
Tabla 2: factores reducen la eficacia de la vitrificación (Extraída de Liebermann <i>et al.</i> , 2002)....	4
Tabla 3: Crioprotectores más utilizados en reproducción asistida para óvulos y embriones de distintas especies (Extraída de Swain and Smith, 2010).....	5
Tabla 4: Comparación supervivencia de embriones en los diferentes medios y estadios (experimento 1).....	21
Tabla 5: Comparación supervivencia de embriones en los diferentes medios y estadios tras la vitrificación (experimento 2).....	23

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Técnicas de reproducción asistida**
- 1.2. Fundamentos de vitrificación**
- 1.3. Características crioprotectores y medios de vitrificación**
- 1.4. Limitaciones vitrificación**
- 1.5. Avances vitrificación**
- 1.6. Vitrificación de embriones humanos**
- 1.7. Vitrificación de embriones de conejos**

1.1. Técnicas de reproducción asistida (TRA)

La infertilidad ha sido un problema desde tiempos inmemorables e incluso a día de hoy se sigue considerando un estigma social. Desde la antigüedad se han buscado soluciones a la infertilidad, ya sea a través de ritos o tradiciones para concebir e incluso llegó a plantearse el concepto de inseminación artificial (cultura Védica 3500 a.C.-500d.C.). El principal motivo de revertir la infertilidad en esta época era el desprestigio y desprecio hacia las mujeres incapaces de tener un hijo, ya que en muchas culturas suponía un motivo legítimo para la nulidad o invalidación del matrimonio. Otra de las opciones para superar este problema era un segundo matrimonio o un compromiso temporal con otra mujer, lo que podríamos asemejar hoy en día a un vientre de alquiler.

Ya en el siglo VII en Grecia se estableció la infertilidad humana como un problema médico que requería diagnóstico y tratamiento, no obstante, las bases científicas y las herramientas biotecnológicas en las que se sustentan los actuales Tratamientos de Reproducción Asistida (TRA) comenzaron a establecerse en el informe publicado en el “Bulletin of the New York Academy of Medicine” por Alan Guttmacher en 1943 titulado “The role of artificial insemination in the treatment of human sterility” (Sharma *et al.*, 2018).

Las TRA incluyen técnicas como la superovulación, inseminación artificial (IA), fecundación *in vitro* (FIV), obtención y evaluación de embriones *in vivo*, cultivo de embriones, criopreservación, diagnóstico genético preimplantacional y transferencia de embriones entre otras (García-Domínguez *et al.*, 2019). Hoy en día estas técnicas aparte de ayudar a superar la infertilidad humana que afecta, al menos, al 10% de la población en edad reproductiva, contribuyen, además, tanto a mejorar la producción animal mediante la diseminación de razas, líneas o individuos de alto valor genético como a la preservación de recursos genéticos animales, evitando la pérdida de biodiversidad animal fundamentalmente en especies de mamíferos en peligro de extinción o sometidos a erosión genética (Evans, 1999; Holt y Picard, 1999).

El desarrollo de las TRA y con ello de la posibilidad de obtener y/o producir *in vitro* gran número de gametos y embriones, conllevó la necesidad de conservarlos con la finalidad de facilitar su uso y gestión. Así, Polge *et al.* (1949) estableció las bases de la criopreservación del esperma empleando glicerol para congelar con éxito espermatozoides de vacuno y almacenarlos a -196°C. Posteriormente, (Bunge y Sherman, 1953), demostró que el esperma humano preservaba el potencial fertilizante tras la descongelación, dando lugar al primer embarazo con esperma congelado.

La criopreservación es una técnica que busca mantener en estado latente óvulos, espermatozoides y embriones mediante el descenso de la temperatura, permitiendo la reanudación de las funciones normales tras retornarlos a la temperatura fisiológica. Está enfocado a la conservación a largo plazo a temperaturas por debajo de cero, empleando principalmente nitrógeno líquido que se encuentra a -196°C. Existen dos técnicas de criopreservación: la congelación y la vitrificación. La principal diferencia entre las dos técnicas es como evitar la formación de hielo intracelular. La **congelación** se basa en una bajada lenta y progresiva hasta el entorno de -35°C antes de sumergir las células en nitrógeno líquido, permitiendo una progresiva deshidratación de la célula en presencia de sustancias crioprotectoras a concentraciones bajas. La congelación fue descrita para conservar embriones con éxito por primera vez en los años 70, ratón (Wilmut, 1972 y Whittingham *et al.*, 1972), en vaca (Wilmut y Rowson, 1973) y en los años 80

por primera vez en humanos (Trounson y Mohr, 1983). La congelación de óvulos, menos eficiente, se pudo lograr con éxito en ratón en 1976 (Parkening et al., 1976), en humana (Chen, 1986), en conejo (Al-Hasani *et al.*, 1989) o en vacuno (Fuku *et al.*, 1992).

Por otro lado, la **vitrificación** expone a las células a concentraciones elevadas de crioprotectores durante un breve periodo de tiempo y las introduce directamente en nitrógeno líquido (Kaartien *et al.*, 2016). La primera vitrificación exitosa para embriones fue descrita en ratón por Rall y Fahy (1985), en humano por Friedler *et al.* (1988) y en vacuno Liehman (1991). Mientras que la vitrificación de ovocitos humanos fue descrita por primera vez por Pensis *et al.* (1989), en ratón por Nkagata (1989) y en vacuno por Kuwayama *et al.* (1992) y Hamano *et al.* (1992).

1.2. Fundamentos de vitrificación

La vitrificación es una técnica de criopreservación ultrarrápida aplicada para preservar partículas virales (Adrian *et al.*, 1984) y utilizada para preservar embriones por primera vez por Rall y Fahy (1985). Actualmente, es quizá el método más empleado debido a que su eficiencia, en términos de tasa de supervivencia post-desvitrificación, al menos, es igual o superior a la obtenida por congelación tanto en óvulos como en embriones.

En la vitrificación, las células son deshidratadas al ser expuestas a altas concentraciones de crioprotectores antes del inicio del enfriamiento, a diferencia de en la congelación donde la deshidratación ocurre durante el enfriamiento (Rall y Fahy, 1985; Fahy y Rall, 2007).

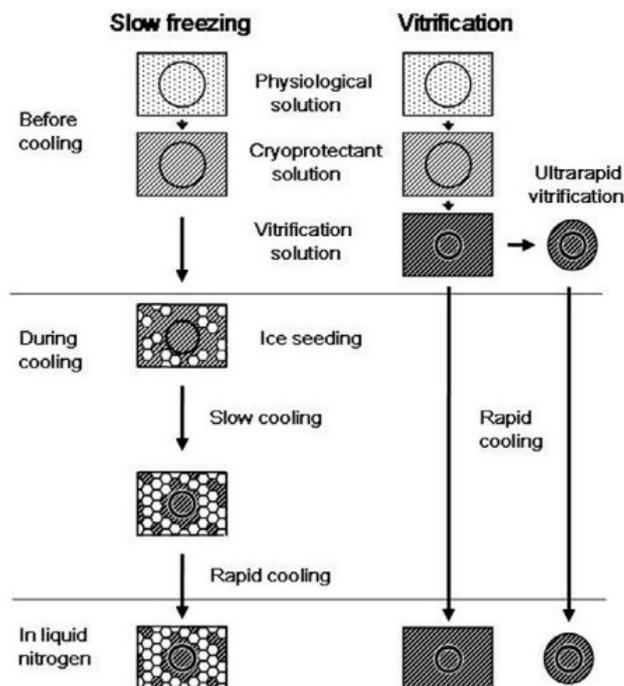


Figura 1: Imagen comparación procesos: Proceso de congelación y vitrificación, antes del enfriamiento durante y una vez en nitrógeno líquido. Los hexágonos simbolizan la formación de cristales de hielo (Adaptada de Fahy y Rall, 2007).

La vitrificación es definida como la transición de una disolución acuosa de estado líquido a vítreo en condiciones de alta viscosidad, bajas temperaturas y sin la formación de cristales de hielo intra y extracelulares, evitando los daños mecánicos producidos por estos en las células. (Knoc *et al.*, 2014). Las condiciones necesarias para la vitrificación producen una ralentización de los movimientos de traslación molecular, es por ello por lo que la reordenación molecular en cristales de hielo está inhibida, hecho que no ocurre durante la congelación. (Griveau *et al.*, 2015). El proceso consiste en una combinación de diferentes crioprotectores (CPA) a concentraciones elevadas (4-8 mol/L) y la aplicación de una velocidad extremadamente elevada de enfriamiento (ultrarrápida) cuando se aplica sobre gametos y embriones, llegando a alcanzar velocidades de enfriamiento superiores a $-15.000^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (Fahy y Rall, 2007; Kasai y Mukaida, 2004).

El proceso de vitrificación de óvulos y embriones puede desarrollarse en **dos o tres pasos**. Cuando se realiza en dos o tres pasos, los pasos iniciales consisten en suspender las células en un medio denominado de equilibrio que posee una concentración menor de crioprotectores, en el cual se permite que las células se equilibren osmóticamente tras su exposición a los crioprotectores. Tras esto, son introducidas en el medio de vitrificación por un periodo corto de tiempo y, a continuación, sin permitir que se produzca el equilibrio osmótico, son sumergidas en nitrógeno líquido. La desvitrificación se realiza en un medio de desvitrificación atemperado y debe realizarse con rapidez debido a la toxicidad de los crioprotectores. Además, para evitar y contener el estrés osmótico generado por la salida de los crioprotectores permeables, el medio de desvitrificación suele ser hiperosmolar, utilizando por ejemplo medios que contienen de 0,33 a 1M de sacarosa.

Ofrece una serie de ventajas con respecto a la congelación (Tabla 1): desde un punto tecnológico, elimina la necesidad del equipamiento que controla el enfriamiento lento, convirtiendo a la técnica en más sencilla y económica.

Tabla 1: ventajas de vitrificación (Extraída de Liebermann *et al.*, 2002)

Ventajas de la vitrificación
Contacto directo de la muestra con el nitrógeno líquido
No formación de cristales de hielo
Menor tiempo de exposición a crioprotectores
Rápida vitrificación y desvitrificación
Pequeño volumen
Ratios de enfriamiento aprox. $15.000-30.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$
Minimiza los daños osmóticos
Reduce tiempos del proceso de vitrificación
Protocolo muy simple
Elimina los costes de equipamiento de congelación programable

El principal problema de la vitrificación son las elevadas concentraciones de crioprotectores necesarios para el proceso ya que resultan tóxicos para las células. Es por ello que hay que considerar varios aspectos: la viscosidad del medio, el volumen y la concentración de crioprotectores. La **viscosidad** del medio tiene un efecto directo en la vitrificación: cuanto mayor

es la concentración de crioprotectores, mayor será la temperatura de transición vítrea y menor la probabilidad de nucleación y cristalización. El **volumen** tiene una proporcionalidad inversa en las tasas de supervivencia de la vitrificación: cuanto menor volumen mayor probabilidad de vitrificación exitosa ya que los volúmenes reducidos facilitan el intercambio de calor. (Griveau *et al.*, 2015). La **concentración de crioprotectores** va ligada a la toxicidad del medio: cuánto mayor la concentración mayor la toxicidad. Sin embargo, puede reducirse esa toxicidad mediante la combinación de diferentes crioprotectores, reduciendo la concentración relativa de cada crioprotector; y reduciendo el tiempo de exposición a los crioprotectores (Rall y Fahy, 1985; Fahy y Rall, 2007)

Tabla 2: factores reducen la eficacia de la vitrificación (Extraída de Liebermann *et al.*, 2002)

Factores que reducen la efectividad de la vitrificación
Tipo y concentración de crioprotectores
Medio usado como medio base
Temperatura del medio de vitrificación
Tiempo de exposición al medio de vitrificación
Variabilidad del volumen de crioprotector que rodea la muestra
Dispositivo empleado para la vitrificación
Habilidad del embriólogo
Calidad y estado de desarrollo de la muestra
Posibilidad de contaminación al sumergir en nitrógeno líquido

1.3. Características de los crioprotectores y medios de vitrificación

Los crioprotectores son sustancias que se emplean en la vitrificación cuya finalidad es evitar o minimizar la velocidad de crecimiento de hielo y la modificación de la forma de los cristales, evitando los daños moleculares producidos en el proceso.

Existen dos tipos de crioprotectores dependiendo del lugar de acción en la célula: permeables y no permeables.

Los **crioprotectores permeables** son aquellos que penetran al interior celular. Son generalmente compuestos de bajo peso molecular, hidrofílicos, no iónicos y elevada solubilidad en agua difundiendo a través de la membrana reemplazando el agua intracelular (gran capacidad deshidratante) y reduciendo tanto el punto de congelación del citoplasma celular o del medio en el que se encuentran las células, como el tamaño y cantidad de cristales de hielo que se forman durante el proceso. De hecho, si su concentración es lo suficientemente alta favorecen la formación de estados vítreos. Sin embargo, los grupos hidroxilo y sulfóxido de algunos de ellos generan toxicidad que, además, dependerá de la concentración y la temperatura de exposición (Liebermann *et al.*, 2003 y Arav, 2014).

El dimetilsulfóxido (DMSO) fue de los primeros crioprotectores empleados en la vitrificación de embriones (Rall y Fahy, 1985). Aunque tiene una gran toxicidad debido a su gran polaridad, por lo que se ha empleado junto a crioprotectores menos tóxicos, como el etilenglicol (EG) o el propilenglicol (PG) y que proporciona mayor estabilidad del estado vítreo (Baudot *et al.*, 2000 y Ri-Cheng, 2010). Requiere de una concentración mínima de 5M, una velocidad de enfriamiento de más 500°C/min y un volumen inferior a un ml para evitar la formación de hielo

(Baudot et al, 2000). Mientras que el PG y EG poseen baja toxicidad y requieren una concentración mínima de 4M y 6,5M respectivamente, favoreciendo una menor tendencia a la formación de hielo. Además, el PG es empleado comúnmente en embriones humanos, aunque produce formaldehído que es perjudicial para los gametos. (Shaw y Jones, 2003)

Los **crioprotectores no permeables** son aquellos que actúan extracelularmente. Son polímeros con un tamaño excesivo para poder perfundir a través de la membrana, generalmente disacáridos. Actúan aumentando la osmolaridad extracelular favoreciendo la deshidratación celular. Posiblemente algunos de estos proporcionen protección a la membrana plasmática. (Meryman, 1966; Shaw y Jones, 2003). Esta clase de crioprotectores resultan menos tóxicos al no acceder al interior celular y suelen combinarse con algún crioprotector permeable. (Liebermann *et al.*, 2003; Chian, 2010 y Vicente *et al.*, 2012). Generalmente son administrados en una concentración de 0,1 a 1 M (Shaw y Jones, 2003; Knoc *et al.*, 2014). Algunos ejemplos son sacarosa, trehalosa o lactosa (disacáridos), dextrano o ficoll (polisacáridos) y la polivinilpirrolidona (PVP) de naturaleza no glucídica.

Tabla 3: Crioprotectores más utilizados en reproducción asistida para óvulos y embriones de distintas especies (Extraída de Swain and Smith, 2010)

Crioprotector	Tipo de célula	Especies ejemplo
PERMEABLES		
Dimetilsulfóxido	Óvulos, embriones	Ratón, humano, vaca
Acetamida	Óvulos, embriones	Ratón, conejo, cerdo, rata
Butilenglicol	Óvulos, embriones	Ratón, humano, ovejas
Glicerol	Óvulos, embriones	Ratón, oveja, humano, rata
Eritriol	Embriones	Rata
Arabitol	Embriones	Rata
Perseitol	Embriones	Rata
Xylitol	Embriones	Rata
NO PERMEABLES		
Sacarosa	Óvulos, embriones	Ratón, humano, vaca
Trehalosa	Óvulos, embriones	Ratón, humano, caballo, vaca
Rafinosa	Óvulos	Ratón, caballo
Dextrano	Embriones	Gato, ratón, conejo
Ficoll	Óvulos, embriones	Ratón, humano, vaca
Polietilenglicol	Óvulos, embriones	Ratón, humano, vaca
Polivinilpirrolidona	Embriones	Ratón
Polivinilalcohol	Óvulos, embriones	Ratón, oveja, vaca
Ácido hialurónico	Embriones	Ratón, oveja, vaca, cerdo

Los **medios** empleados en **vitrificación** suelen contener un 30-40% de crioprotectores permeables y entre 0,1M a 1M de no permeables (Shaw y Jones, 2003). En general en los medios de **equilibrio**, solamente se emplean crioprotectores permeables (o una combinación) alcanzando una concentración máxima de 3M (20% V/V) y un tiempo variable de exposición (2 a 10 min), siendo mayor para óvulos y embriones de estadios de cigoto hasta 8-16 células. Mientras que la exposición al medio final (medio de **vitrificación**) se reduce a menos de 1 minuto, debido a su elevada toxicidad).

Como se ha comentado anteriormente, a pesar de los beneficios que aportan, los crioprotectores son dañinos para la células. Su toxicidad viene directamente relacionada con la estructura química del crioprotector, la concentración, el tiempo de exposición y la temperatura (Liebermann *et al.*, 2003). La toxicidad de los **crioprotectores permeables** deriva del estrés osmótico que producen en su entrada y salida, la fuerza iónica con la que retiene las moléculas de agua, de su metabolismo en productos que provocan daños por oxidación lipídica, de su capacidad para desestabilizar la estructura cuaternaria de las proteínas, provocando desordenes tanto en el citoesqueleto celular como en el huso mitótico o meiótico.

Los medios de **desvitrificación** solamente contienen crioprotectores no permeables a concentraciones de 0,33-1M, permitiendo reducir la toxicidad del medio de vitrificación y las fluctuaciones osmóticas (Mochida *et al.*, 2013).

Además de los crioprotectores, se pueden suplementar los medios con otras sustancias que también tienen la capacidad de evitar la cristalización, los “ice-blockers” (Martínez-Páramo *et al.*, 2008; Badrzadeh *et al.*, 2010 y Marco-Jiménez *et al.*, 2012).

1.4. Limitaciones de vitrificación

A pesar de sus numerosas ventajas, la vitrificación todavía enfrenta desafíos, especialmente en relación con la toxicidad de los crioprotectores empleados en el proceso. Existen problemas en la conservación de ciertos estadios embrionarios (tempranos) y también embriones producidos *in vitro*, que tienden a presentar una mayor sensibilidad al enfriamiento y a la exposición a crioprotectores.

1.4.1. Estadios de desarrollo temprano

Dentro de una misma especie existen diferentes tolerancias a la crioconservación dependiendo del estadio embrionario. Se ha observado que tanto embriones producidos *in vivo* como *in vitro* presentan una menor supervivencia post-desvitrificación cuando se emplean estadios tempranos frente a embriones que han alcanzado el estado de mórula o blastocisto (Gajda y Smorag, 2009). Los estadios tempranos comprenden desde el estadio de pronúcleo a 16 células.

Este tipo de embrión presenta mayor sensibilidad a la velocidad de bajada de temperatura, al estrés osmótico y elevadas concentraciones de crioprotector. Es por ello, que en muchas especies no se ha conseguido una vitrificación tan efectiva como con los estadios de mórula compacta y blastocisto. La composición de la membrana de los blastómeros, las conexiones entre ellos y el tamaño parecen ser una parte de la baja tolerancia de estos estadios tempranos. Así, por ejemplo, en estadios tempranos, de menos de 8 células en conejo, se observa que los blastómeros embrionarios no tienen las acuaporinas que facilitarían un menor estrés osmótico cuando los embriones son expuestos a medios hiperosmolares (Vatja y Kumayawa, 2006; Gajda y Smorag, 2009).

1.4.2. Embriones producidos *in vitro*

Numerosos estudios muestran que los embriones producidos *in vitro* no producen la misma supervivencia tras la vitrificación que los embriones producidos *in vivo*. Se obtienen tasas de supervivencia menores de los embriones producidos *in vitro* (Massip *et al.*, 1995; O’Kearney-Flynn *et al.*, 1998).

Estos embriones tienen una mayor sensibilidad al enfriamiento debido al alto contenido en lípidos que producen y almacenan en respuesta al cultivo en medios suplementados fundamentalmente con suero. No obstante, la concentración de lípidos de los embriones producidos *in vitro* puede ser modificada mejorando la composición del medio y condiciones de cultivo o mediante centrifugación. En general, esto reduce el contenido lipídico y aumenta la tolerancia al frío y por tanto la supervivencia de los embriones *in vitro* (Esaki *et al.*, 2004).

1.5. Avances vitrificación

La principal forma de mejorar el proceso es minimizar los volúmenes, ya que cuanto menor sean más velocidad de enfriamiento se obtiene y menores son las concentraciones de crioprotector necesarias para lograr una vitrificación y desvitrificación efectiva (Lee *et al.*, 2007; Saragusty y Arav, 2011). De esta manera, se limitan los efectos tóxicos y de estrés osmótico de los crioprotectores.

Al emplear métodos de mínimo volumen ($>1\mu\text{L}$) como el Cryotop, las velocidades de enfriamiento y calentamiento alcanzan los -22.800 y $42.100^\circ\text{C}/\text{min}$ respectivamente, lo que permite utilizar una concentración final de crioprotectores permeables, de en torno al 32% (V/V) y obtener mejores resultados de supervivencia (Kuwayama *et al.*, 2005).

Se han diseñado una serie de dispositivos que permiten reducir el volumen de muestra. Podemos clasificarlos en: **técnicas superficiales** y **técnicas con envases tubulares**.

Entre las **técnicas superficiales** cabe destacar las rejillas para microscopía electrónica (EM) (Steponkus *et al.*, 1990), mínimo tamaño de gota (Yavin y Arav, 2001), CryoTop (Hamawaki *et al.*, 1999), Cryoloop (Lane *et al.*, 1999) y Hemi-straw (Vanderzwalem *et al.*, 2000).

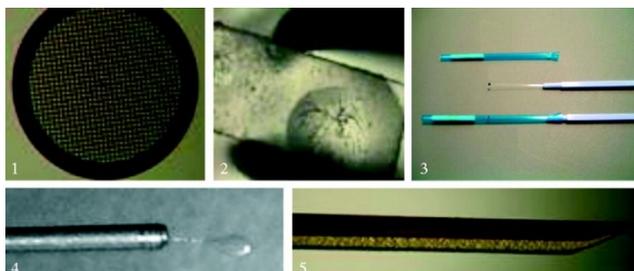


Figura 2: Soportes superficiales de vitrificación: (1) rejillas EM, (2) mínimo tamaño de gota, (3) Cryotop, (4) Cryoloop y (5) Hemi-straw. (Adaptada de Saragusty y Arav, 2011)

Entre las técnicas que emplean **envases tubulares** cabe destacar las pajuelas de plástico (Rall y Fahy, 1985), pajuelas estiradas cerradas (Chen *et al.*, 2001), pajuelas estiradas abiertas (OPS) (Vajta *et al.*, 1997), flexipet-denuding pipette (Liebermann *et al.*, 2002b), OPS superfina (Isachenko *et al.*, 2003), dispositivo para la vitrificación de alta seguridad (Camus *et al.*, 2006) y CryoTip (Kuwayama *et al.*, 2005).

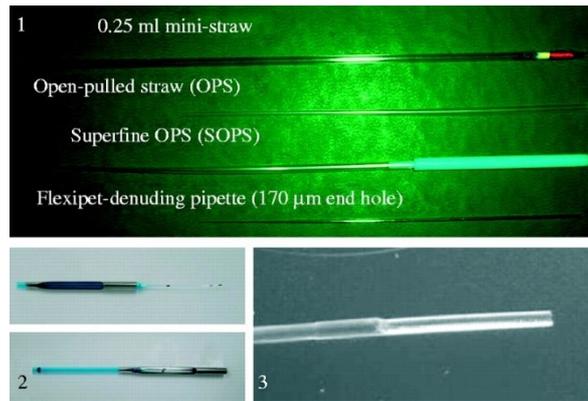


Figura 3: Envases tubulares de vitrificación: (1) pajuelas de plástico, pajuelas estiradas abiertas (OPS), pajuelas estiradas abiertas superfinas (SOPS) y flexipet-denuding pipette; (2) Cryotip y (3) dispositivos de vitrificación de alta seguridad (Adaptada de Saragusty y Arav, 2011)

El cryotop es el soporte que mejores resultados ofrece en términos de supervivencia. Otros soportes como GL-tip o Cryoloop en la vitrificación de embriones en estadio de pronúcleo ofrecen peores resultados. Por otro lado, se han conseguido resultados similares empleando asas de siembra de plástico de aro, como alternativa económica al Cryotop (Marco-Jiménez *et al.*, 2016).

Existe un creciente interés en la búsqueda de medios de protocolos de vitrificación más seguros y eficientes. El principal foco es el desarrollo de medios de vitrificación que sean capaces de conservar la integridad y viabilidad de los embriones sin comprometer la calidad. Dado este interés, este trabajo estudia un nuevo medio de equilibrio basado exclusivamente en una combinación de crioprotectores no permeables como el Ficoll y trehalosa como una alternativa a los protocolos y medio convencionales. El **Ficoll**, polímero de origen marino, tiene propiedades antioxidantes y crioprotectoras, lo que lo hace interesante en la mejora de la supervivencia y desarrollo embrionario en la vitrificación. Por otra parte, la **trehalosa**, un azúcar disacárido, tiende a preservar la viabilidad celular y la integridad de las membranas, convirtiéndose en un crioprotector ideal para la vitrificación.

1.6. Vitrificación de embriones humanos

Cuando la vitrificación se aplica sobre **cigotos** humanos ofrece unas tasas de supervivencia post-desvitrificación de cigotos entre el 70-80% (sin daños morfológicos aparentes) (Isachenko *et al.*, 2003). Así, por ejemplo, Al-Hasani *et al.* (2007) sobre 339 cigotos obtuvo una tasa de supervivencia del 89%, una tasa de implantación del 15,6% y una tasa de embarazo del 36,9%, mientras que Griesinger *et al.* (2007) obtuvieron una supervivencia del 77,8% y una tasa de embarazo del 29,2%. Los resultados de la aplicación de una u otra técnica sobre cigotos humanos (congelación o vitrificación) han mostrado una ligera mejora en la tasa de desarrollo de estos embriones hasta blastocisto cuando son vitrificados, 56% vs 51% respectivamente (Kuwayama *et al.*, 2005).

En su aplicación sobre **embriones de día 2 y 3**, los resultados indican que es posible obtener hasta un 95% de embriones viables in vitro post-desvitrificación y unas tasa de

implantación algo inferior al de los embriones no criopreservados (18,1 vs 23,5%, respectivamente, Rama-Raju *et al.* (2005). Al comparar la vitrificación con la congelación lenta las tasas de supervivencia no mostraron diferencias significativas para las tasas de implantación entre las dos técnicas. Kuwayama *et al.*, (2005) muestra un 27% vs 30% entre embriones vitrificados y congelados respectivamente, mientras que Vutyavanich *et al.* (2008) obtuvo unas tasas de implantación de 10,98% vs 10,9% respectivamente.

La vitrificación de embriones en estadio de **blastocisto** ofrece los mejores resultados, probablemente porque estos estadios son más tolerantes a las exigentes condiciones de la vitrificación, elevada toxicidad debida a la elevada concentración de los crioprotectores y el estrés osmótico derivado de la entrada y salida de éstos. Las tasas de supervivencia post-vitrificación son en su mayoría superiores al 90% y con tasas de implantación entre el 21-67% (Mukaida *et al.*, 2003; Ebner *et al.*, 2009; Vanderzwalmen *et al.*, 2009; Lieberman, 2009; Goto *et al.*, 2011 y Cobo *et al.*, 2012). En los estudios retrospectivos en los que se han comparado ambos procedimientos, la vitrificación de blastocistos de 5 días daba lugar a significativas mejoras en la supervivencia *in vitro* post-criopreservación, 100% frente al 83,1% de la congelación, y en las tasas de implantación, 19,4% frente al 7,4% de la congelación. Además, se observó un aumento de las tasas de embarazo también en la vitrificación, 50,4% frente al 25,9% de la congelación (Stehlik *et al.*, 2005). La comparación de la transferencia de blastocitos vitrificados frente a blastocitos no criopreservados ha mostrado unas tasas de implantación similares (Zech *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2005; Van Landuyt *et al.*, 2011).

1.7. Vitrificación de embriones de conejo.

El desarrollo de las TRA en conejo como la inseminación y la crioconservación embrionaria están contribuyendo tanto en la difusión genética de líneas seleccionadas como a la evaluación de los programas de selección y a la conservación de recursos genéticos. Mientras que la IA ha contribuido a la diseminación genética, la criopreservación de gametos y embriones ha contribuido a la creación de bancos de germoplasma, para evaluar el progreso genético y evitar la erosión o pérdida de recursos genéticos de la especie (Vicente *et al.*, 2023)

Los embriones en conejo suelen ser obtenidos post-mortem, pero podrían obtenerse por medio de una laparoscopia o laparotomía, aunque el coste de dichas intervenciones hace que esta alternativa sea poco común. (Besenfelder *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2005; Cortell *et al.*, 2010; García-Domínguez *et al.*, 2019).

Al igual que en cualquier otra especie, la eficiencia de la vitrificación depende de las tasas de supervivencia en el nacimiento, la cual depende del crioprotector empleado y el estadio embrionario. En conejos, las mórulas son los estadios habitualmente criopreservados ya que producen la mayor tasa de descendencia al transferir, 25% al 65% según la línea o raza de la donante, si se aplican tratamientos de superovulación, si se utilizan embriones de donantes individuales o mezclas de embriones de varias e incluso de la conejas receptora de los mismos. Mientras que tanto para ovocitos como cigotos sólo hay unos pocos estudios que informen de descendencia viva tras la vitrificación, 3,3-13,2% en ovocitos y 3,7-36% en cigotos.

Uno de los primeros trabajos que describe un protocolo de vitrificación en embriones de conejo fue el de Smorag *et al.* (1989) que utilizó un medio vitrificación basado en propanodiol y glicerol en diferentes concentraciones (30 o 35%) y sobre embriones en estadios de 1, 2 y 8-16 células, así como estadios de mórula y blastocisto, siendo sus resultados de supervivencia relativamente bajos. Kasai *et al.* (1992) y Vicente y García-Ximénez (1994) con medios basados, el primero en etilenglicol-ficoll-sacarosa y el segundo con dimetilsulfóxido y etilenglicol lograron supervivencias superiores al 50% al parto a partir de mórulas de 72h post-coito.

El Cryotop fue empleado con éxito por primera vez en conejo, para ovocitos y embriones, (Hochi *et al.*, 2004) obteniendo una supervivencia de $53\pm 5,1\%$ (Marco-Jiménez *et al.*, 2013) y $40\pm 7,1\%$ (Marco-Jiménez *et al.*, 2016). Recientemente se ha desarrollado un dispositivo que mejora los resultados en algunos aspectos comparado con el Cryotop, concretamente la tasa de implantación y las pérdidas embrionarias, CryoEyelet, un dispositivo impreso en 3D, que además permite la vitrificación de numerosos embriones simultáneamente. (Marco-Jiménez *et al.*, 2023).

Como se ha comentado anteriormente, las dificultades en la criopreservación de ovocitos y cigotos puede deberse a peculiaridades específicas de los estadios tempranos que los vuelven extremadamente sensibles a la vitrificación, como un ratio bajo de superficie/volumen, sensibilidad de los microtúbulos y microfilamentos a las altas concentraciones de crioprotectores. Adicionalmente, los embriones de conejo tienen la característica específica de poseer una capa de mucina adicional que se crea durante el paso del embrión por el oviducto. En el cultivo de ovocitos y cigotos, no se permite ese paso por el oviducto y por tanto no se deposita la capa de mucina, lo que produce el descenso en la viabilidad postparto (Murakami *et al.*, 1996; Denker, 2000; Marco-Jiménez y López-Bejar, 2013; Kulíková, 2016)

En conejo, se han ensayado distintas estrategias para mejorar la capacidad de supervivencia de los embriones. Una de ellas es el uso de polímeros sintéticos para evitar la formación de hielo (concretamente SuperColl Z-1000 y SuperCool X-1000). Estos dos crioprotectores creaban una película plastificada sobre los embriones que parecía afectar la capacidad de los embriones para implantar (Marco-Jiménez *et al.*, 2014).

En el conejo se ha descrito, como consecuencia de la vitrificación, alteraciones en el transcriptoma y en el proteoma de la placenta fetal, menor tamaño fetal y de la placenta materna a los días 10 y 14 de gestación, mayor peso corporal durante las primeras cuatro semanas de vida e incremento del peso del hígado (Mocé *et al.*, 2010; Vicente *et al.*, 2013; Lavara *et al.*, 2014-2015 y Sáenz-de-Juano *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este estudio tiene como objetivo modificar tanto la composición del medio de vitrificación como el protocolo del procedimiento con el fin de mejorar la viabilidad embrionaria de los estadios de 2 y 8-16 células.

Para ello, a un medio de vitrificación basado en dos crioprotectores permeables habituales como el etilenglicol y el dimetilsulfóxido se añadirán dos crioprotectores no permeables (ficoll y trehalosa), utilizando en la etapa de equilibrio tan solo el medio con los crioprotectores no permeables y reduciendo la concentración final del dimetilsulfóxido en el medio de vitrificación del 20% al 12%.

La evaluación de la toxicidad y la efectividad del medio y procedimiento para criopreservar embriones de conejo se realizará atendiendo a su capacidad de desarrollo in vitro hasta el estadio de blastocisto tras ser expuestos al medio y vitrificados y desvitrificados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño experimental

3.2. Animales

3.3. Recuperación de embriones

3.4. Medio de vitrificación de embriones

3.5. Proceso de vitrificación

3.6. Desvitrificación

3.7. Cultivo de embriones

3.8. Valoración calidad embrionaria

3.9. Análisis estadístico

3.1. Diseño experimental

El estudio se diseñó en dos fases (experimentos) y se utilizaron tres estadios embrionarios (2-células, 8-16 células y mórula compactada). En el primer experimento se determinó los efectos tóxicos del nuevo medio tras el paso de los embriones por las etapas de exposición al medio de equilibrio y al de vitrificación, evaluando el desarrollo y viabilidad de embriones de conejo hasta blastocisto en los tres estadios. Para ello los embriones de 2 células se cultivaron 72h, los de 8-16 células durante 48h y las mórulas durante 24h. En un segundo experimento, los estadios embrionarios en el que se superó el 70% de blastocistos desarrollados en la prueba de toxicidad fueron evaluados para determinar la viabilidad *in vitro* una vez vitrificados a -196°C y desvitrificados. De nuevo los embriones desvitrificados fueron cultivados durante un periodo igual al del primer experimento, atendiendo a su estadio de desarrollo.

3.1.1. Experimento 1: Ensayo de la toxicidad de un nuevo medio de vitrificación de embriones de conejo en 3 estadios diferentes

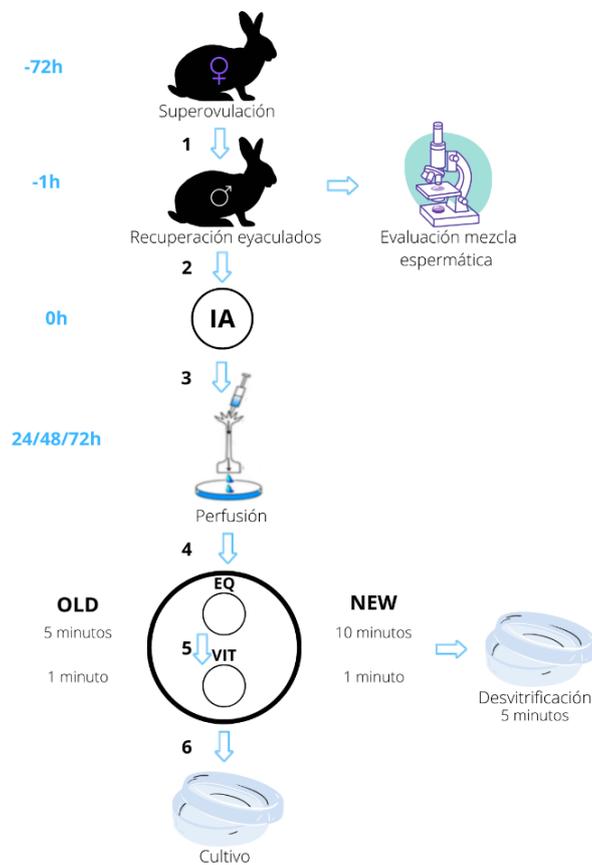


Figura 4: Esquema del protocolo seguido para el desarrollo del experimento 1: Ensayo de la toxicidad de un nuevo medio de vitrificación de embriones de conejo en 3 estadios diferentes.

En primer lugar, se realiza el tratamiento de superovulación (72 horas antes), la preparación de las hembras para la ovulación (1). Se obtienen los eyaculados y se evalúa la mezcla heterospérmica (2). Se realiza la inseminación artificial y se induce la ovulación (3). Se realiza una perfusión del oviducto para la obtención de los embriones a 24h, 48 y 72h post-inseminación (4). Se desarrolla el proceso de vitrificación (medio equilibrio (5 minutos OLD y 10 minutos NEW) (4), vitrificación (1 minuto) (5) y desvitrificación (5 minutos)). Por último, se cultivan los embriones a 38,5°C, 5% CO₂ y humedad a saturación (6).

3.1.2. Experimento 2: Ensayo de vitrificación de embriones en 3 estadios diferentes

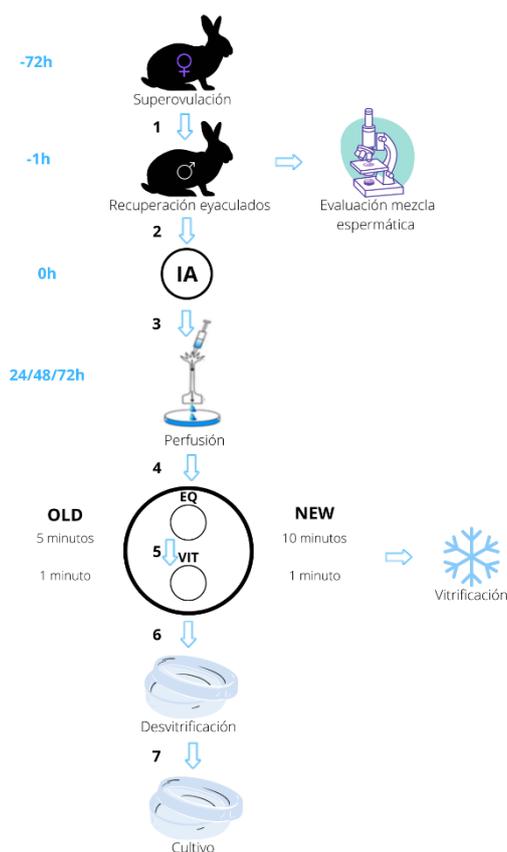


Figura 5: Esquema del protocolo seguido para el desarrollo del experimento 2: Ensayo de vitrificación de embriones en 3 estadios diferentes

En primer lugar, se realiza el tratamiento de superovulación (72 horas antes), la preparación de las hembras para la ovulación (1). Se obtienen los eyaculados y se evalúa la mezcla heterospermica (2). Se realiza la inseminación artificial y se induce la ovulación (3). Se realiza una perfusión del oviducto para la obtención de los embriones a 24h, 48 y 72h post-inseminación (4). Se desarrolla el proceso de vitrificación (medio equilibrio (5 minutos OLD y 10 minutos NEW) (5), vitrificación (1 minuto) y sumersión en nitrógeno líquido) y a continuación la desvitrificación (5 minutos) (6). Por último, se cultivan los embriones a 38,5°C, 5% CO₂ y humedad a saturación (7).

3.2. Animales

Los animales utilizados en este trabajo han sido conejas multíparas con al, menos 4 partos, y machos de la línea A de la granja de Mejora Genética de la Universitat Politècnica de València. Esta línea fue fundada en 1982 a partir de conejos de raza Neozelandés Blanco desde entonces ha sido seleccionada para el carácter tamaño de camada al destete (Estany *et al.*, 1989), actualmente se encuentra en la generación 53.

Se han utilizado 40 conejas donantes y 10 machos. Todos ellos fueron alojados en jaulas individuales en condiciones ambientales controladas, con 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad diarias, una temperatura media diaria de 17 °C y máxima de 25 °C. Fueron alimentados con pienso comercial y disponían de acceso libre a agua.

Los procedimientos experimentales utilizados en este estudio han sido aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la Universitat Politècnica de València y la Dirección General de Agricultura, Pesca y Ganadería de la Comunidad Valenciana, bajo el código GVRTE/2021/2990420.

3.3. Recuperación de embriones de conejas donantes:

El proceso de recuperación de embriones consta de los siguientes pasos: inducción de superovulación, recogida de semen y valoración seminal, inseminación artificial, inducción de ovulación y obtención y catalogación de embriones. Todos estos pasos son explicados con detalle en los siguientes apartados.

3.3.1. Tratamiento de superovulación

Las conejas fueron sometidas a un tratamiento de superovulación con coriofolitropina alfa (Elonva, Organon Healthcare), se aplicó en un única dosis subcutánea de 0,5 ml que contiene 3ug (en torno a 0,75ug por Kg) en la región interescapular, 72 horas antes de la inseminación artificial.



Figura 6: Inyección subcutánea

3.3.2. Recogida de semen

La recogida de espermatozoides se realizó mediante una vagina artificial, siguiendo el método descrito por Vicente *et al.* (2011), dispositivo que busca recrear las vías genitales de la hembra para recoger todo el eyaculado de forma limpia. Esta consiste en un cilindro con una camisa interior de goma llena con agua o aire caliente para simular la temperatura corporal de la hembra y un tubo colector en el otro extremo. Esta conformación específica nos permite imitar los estímulos que produce la vagina, concretamente el estímulo térmico y el mecánico.

En nuestro caso, consiste en un dispositivo plástico cubierto con un preservativo, entre los cuales se añade agua caliente a aproximadamente 50°C, ya que a menor temperatura no se produciría la monta y eyaculación.



Figura 7: Vagina artificial

Se obtuvieron los eyaculados de, al menos, 3 machos, no emparentados, en cada sesión de trabajo para elaborar las dosis seminales con las que se inseminaron las conejas donantes. Las dosis seminales utilizadas tenían en torno a 20 millones de espermatozoides de los que más del 70% son móviles y menos del 20% presentaban anomalías.

3.3.3. Valoración del semen

Se hizo una primera criba de espermatozoides *in situ* tras la recogida del espermatozoides. Al tratarse de unos conejos machos bien caracterizados ya que son los empleados en el laboratorio de forma regular y son estudiados regularmente *in situ*, cada eyaculado es diluido 5 veces con un diluyente específico de conejo (Tris-citríc-glucosa, pH=6,9 300 mOsmKg⁻¹, 0,25M tris-amino, 0,08M amino, 0,05M glucosa y antibióticos, Marco-Jimenez *et al.*, 2010) y evaluada su motilidad a 200x, si más del 70% de los espermatozoides están en movimiento y no se aprecian formas anormales características del conejo como son las anomalías de cola, el eyaculado se clasifica como apto y se mezcla con los otros que alcanzan la misma valoración.

En un segundo momento, se analizaron los parámetros seminales de las dosis elaboradas para inseminar mediante la captación y análisis de las imágenes de los espermatozoides en una cámara Mackler (ISAS, Proiser SL) y se fija una muestra de los espermatozoides con una solución al 0,25% de glutaraldehído en DPBS (tampón fosfato de Dulbecco) con la que se evalúan tanto la concentración en una cámara Neubauer como el porcentaje de formas anormales tras observar 400X en óptica de contraste de fases.

Las dosis de inseminación elaboradas contaron con una media de 42,3 millones de espermatozoides por ml, 82,94% de motilidad y un 16% de anomalías.

3.3.4. Inseminación artificial

La inseminación se realizó 72 horas tras la administración del tratamiento de superovulación. Se realiza mediante unas cánulas largas y acodadas (22 cm) introducidas hasta el fondo de la vagina. La dosis de inseminación fue de 0,5ml de espermatozoides con en torno a 20 millones de espermatozoides.



Figura 8: Cánulas acodadas



Figura 9: Introducción del catéter en la inseminación artificial

3.3.5. Inducción de ovulación

Las conejas donantes fueron inducidas a ovular mediante la administración de un análogo sintético de GnRH (acetato de buserilina). La dosis utilizada fue de 1,6ug diluido en suero salino (0,2 ml intramuscular).



Figura 10: Administración de GnRH

3.3.5. Obtención de embriones

Para la obtención de embriones fue necesaria la eutanasia del animal y la extirpación del aparato reproductor. La eutanasia se realizó mediante electrosedación y desangrado.

Una vez obtenido el aparato reproductor se aislaron los oviductos y un tramo de cada cuerno uterino y se procedió al lavado de estos mediante perfusión con 5ml de medio de cultivo atemperado (37°C) DMEM/HAM'S F10 (50/50) suplementado con 15mM HEPES, 0,2mM piruvato sódico, 10mM lactato sódico y antibióticos (100 UI/ml penicilina/0,25mg/ml estreptomycin).

El contenido del lavado se depositó en un placa P60 para la obtención y lavado de embriones, utilizando un microscopio estereoscópico a 20-40X.



Figura 11: Perforación del oviducto y cuerno uterino

3.3.6. Catalogación de embriones

Una vez obtenidos los embriones, éstos fueron catalogados de acuerdo con el estadio embrionario esperado, 24 horas post-inducción de la ovulación, 2 células, 48h post-inducción de la ovulación de 8 a 16 células y 72h post inducción de la ovulación, mórulas.

Además, se atendió a su morfología, considerando normales cuando las cubiertas (mucina y zona pelúcida) no presentaban irregularidades y los blastómeros eran homogéneos tanto en tamaño como en el aspecto del citoplasma. Solo los embriones en el estado embrionario correcto y sin anomalías morfológicas fueron utilizados en este estudio.



Figura 12: 2 células (24h)



Figura 13: 8-16 células (48h)

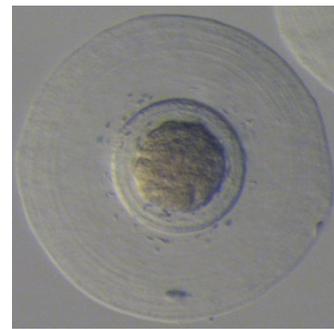


Figura 14: mórula (72h)

3.4. Medio de vitrificación de embriones

En el sistema **OLD** los medios están compuestos únicamente por DMSO y EtOH en distintas concentraciones. Explícitamente en un 10% de ambos (volumen/volumen) en el medio de equilibrio (EQ) y en un 20% (v/v) en el medio de vitrificación (VIT).

Por otro lado, en el sistema **NEW** los medios están compuestos de Ficoll y trehalosa únicamente en el medio de equilibrio (EQ) y junto a DMSO y EtOH en el medio de vitrificación (VIT). Las concentraciones fueron un 17% (peso/volumen) de Ficoll 70 kDa y un 0,5M de trehalosa tanto en el medio de equilibrio como en el de vitrificación, mientras que el medio de vitrificación contenía, además, un 12% (v/v) de DMSO y un 20% (v/v) EtOH.

3.5. Proceso de vitrificación de embriones

El procedimiento de vitrificación en ambos casos es el mismo: una primera etapa (1) por el medio de equilibrio (EQ) y una segunda etapa (2) por el medio de vitrificación (VIT). Tras el pase por el medio de vitrificación los embriones del experimento 1 de toxicidad fueron introducidos directamente en los medios de desvitrificación y los embriones del experimento 2 fueron depositados en la lengüeta de un cryotop (2 μ l) (3) y sumergidos en nitrógeno líquido para la vitrificación (4).

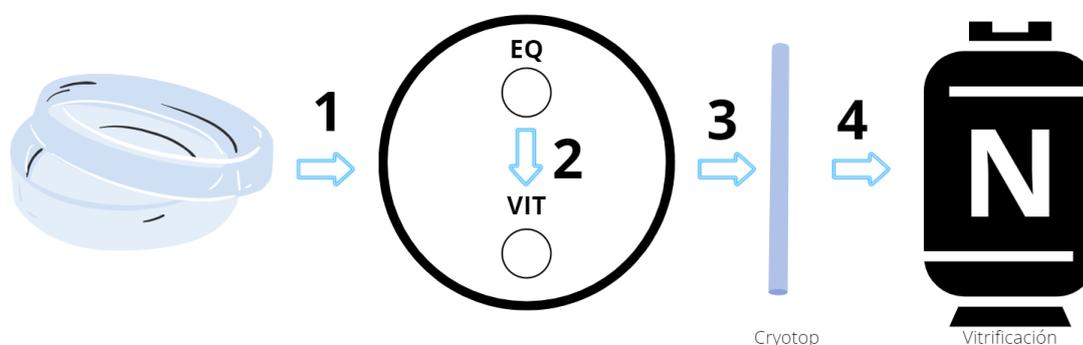


Figura 15: Descripción del proceso de vitrificación



Figura 16: Cryotop

En el caso del medio de equilibrio (EQ), en el sistema **OLD** los embriones permanecieron 5 minutos de acuerdo con el procedimiento descrito por Vicente y García-Ximénez, (1994), mientras que en el sistema **NEW** los embriones fueron expuestos al medio de equilibrio (EQ) durante 10 minutos.

En ambos casos el paso por el medio de vitrificación (VIT) es de 1 minuto, ya que resulta tóxico en exposiciones mayores debido a la alta concentración de crioprotectores.

3.6. Desvitrificación

La desvitrificación de los embriones se realizó rápidamente introduciendo directamente la lengüeta del cryotop a -196°C en 2ml del medio de desvitrificación situado en una placa P35 a temperatura ambiente (1). Posteriormente fueron retirados de la P35 y pasados en grupos de 15-20 embriones al pocillo 1 o 3 de una placa NUNC con medio de cultivo para realizar un lavado (2), tras el que fueron depositados en los pocillo 2 y 4 para el cultivo (3).



Figura 17: Descripción del proceso de desvitrificación

El medio de desvitrificación del sistema **OLD** es un medio de Sacarosa 0,33M (Vicente y García-Ximénez, 1994). Mientras que el medio de desvitrificación del sistema **NEW** está compuesto por 17% de Ficoll y trehalosa 0,5M equivalente al medio de equilibrio de este sistema.

En ambos casos tras el pase del cryotop al medio de desvitrificación, los embriones permanecieron 5 minutos en el medio para la eliminación de parte de los crioprotectores permeables, reduciendo la toxicidad y el estrés osmótico.

3.7. Cultivo de embriones

El cultivo de los embriones se realiza en placas NUNC provistas de un medio de cultivo DMEM/HAM'S F10 (50/50) suplementado con 15mM de HEPES, 0,2mM piruvato sódico, 10mM lactato sódico y antibióticos (100 UI/ml penicilina/0,25mg/ml estreptomycin), previamente filtrado con un filtro de Nylon con poro de diámetro $0,22\mu\text{m}$.

Las condiciones del cultivo en la incubadora fueron de $38,5^{\circ}\text{C}$, humedad a saturación y 5% de CO_2 .

3.8. Valoración calidad embrionaria

En los experimentos 1 y 2 la calidad de los embriones se evalúa midiendo la capacidad de estos de continuar con el desarrollo hasta blastocisto. A las 72h para los embriones de 2 células, a las 48h en los embriones de 8-16 células y a las 24h en las mórulas.



Figura 18: Blastocisto

3.9. Análisis estadístico

Los datos de los experimentos de toxicidad y vitrificación se analizaron con el software SPSS 23.0 utilizando un modelo lineal generalizado de respuesta binaria (1 determinando el éxito-blastocisto- y 0 el fracaso- no desarrollo a blastocisto-) tipo probit-link. El modelo incluía como efectos fijos el estadio embrionario (los 3 descritos) y el medio de vitrificación (los 2 descritos) y su interacción.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Valoración de la toxicidad del medio de vitrificación

4.2. Valoración del desarrollo embrionario tras la vitrificación

4.1. Valoración de la toxicidad del medio de vitrificación

Para la elaboración del presente estudio se emplearon un total de 464 embriones.

El desarrollo de los embriones hasta alcanzar el estadio de blastocisto fue valorado a las 72, 48 y 24 horas para los embriones de 24, 48 y 72 horas respectivamente. El total de embriones que tras el periodo de incubación alcanzaron el estadio de blastocisto se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Efecto del estadio embrionario y el medio de vitrificación sobre la tasa de desarrollo a blastocisto de embriones de conejo.

Estadio	CONTROL LSM ± es	OLD LSM ± es	NEW LSM ± es	Total LSM ± es
24h	0,88 ± 0,049 (43)	0,68 ± 0,073 (41)	0,73 ± 0,069 (41)	0,78 ± 0,038 ^a (125)
48h	0,94 ± 0,034 (50)	0,84 ± 0,053 (49)	0,88 ± 0,044 (52)	0,89 ± 0,026 ^b (151)
72h	0,91 ± 0,030 (91)	0,87 ± 0,048 (48)	0,84 ± 0,053 (49)	0,88 ± 0,025 ^b (188)
Total	0,91 ± 0,022^A (184)	0,81 ± 0,034^B (138)	0,82 ± 0,032^B (142)	0,85 ± 0,017 (464)

OLD: (EQ) 10% DMSO+10% EtOH, (VIT) 20% DMSO + 20% EtOH; (DesVIT) 0,33M sacarosa

NEW: (EQ) 17% Ficoll + 0,5M trehalosa, (VIT) 17% Ficoll + 0,5M trehalosa + 12% DMSO + 20% EtOH; (DesVIT) 17% Ficoll + 0,5M trehalosa

LSM ± es: medias cuadradas ajustadas por mínimos cuadrados ± el error estándar de los datos
^{a, b}: valores en las columnas con diferentes superíndices difieren estadísticamente (P<0,05) por efecto del medio

^{A, B}: valores en las columnas con diferentes superíndices difieren estadísticamente (P<0,05) por efecto del estadio.

El tipo de medio y el estadio embrionario resultaron significativos, sin embargo; la interacción de ambos no resultó significativa (tabla 5).

Los resultados obtenidos muestran que la toxicidad de ambos medios de vitrificación (OLD y NEW) fue similar y no significativamente diferentes, aunque se observa una ligera mejoría en el desarrollo de estadios tempranos con el medio a base de Ficoll y trehalosa (NEW). En los embriones de 24 horas se obtiene un 0,68 ± 0,073 vs 0,73 ± 0,069 en los medios OLD y NEW respectivamente. Mientras que en los embriones de 48 horas se obtiene un 0,84 ± 0,053 vs 0,88 ± 0,044 respectivamente. Comparando estos resultados con el Control (embriones sin exposición al medio de vitrificación), observamos un descenso significativo de los ratios de supervivencia cuando son expuestos a ambas soluciones de vitrificación. No obstante, fue posible obtener, al menos, un 80% de supervivencia en ambos medios.

Kasai *et al.* (1992) observaron un efecto positivo al incorporar sacarosa al medio de vitrificación (40% -v/v- de etilenglicol y 17% -p/v- de ficoll, EF) sobre la viabilidad de mórulas expuestas durante 5 minutos, alcanzando una tasa de desarrollo a blastocisto del 98% frente al 52% con el medio sin sacarosa. En nuestro caso, ambos medios OLD y NEW obtienen resultados similares en el ensayo de toxicidad no aportando el medio NEW ventajas sobre el porcentaje de mórulas que alcanzan tras 24h el estadio de blastocisto. Los resultados de viabilidad alcanzados en nuestro estudio para este estadio embrionario fueron inferiores a los obtenidos por estos autores con un medio basado en etilenglicol y suplementado con Ficoll y sacarosa y a los obtenidos por Vicente y García Ximénez (1994) con el medio OLD, con el que tras 24 horas de cultivo alcanzaban una tasa de desarrollo a blastocisto del 93% y superiores a los obtenidos por estos autores cuando utilizaban un medio con un 40% de etilenglicol (60%). Las diferencias observadas podrían responder tanto al origen genético de los embriones, al tratamiento de superovulación empleado o las condiciones de cultivo. Así en el estudio de Kasai *et al.* (1992) los embriones pertenecían a donantes de la raza japonesa, el tratamiento de superovulación fue FSH+hCG, y los embriones fueron cultivados en TCM199 +10% FBS a 37°C mientras que Vicente y García Ximénez (1994), utilizando la misma línea de conejos (origen New Zealand White), no utilizan ningún tratamiento de superovulación de conejas ya que éste puede reducir la criotolerancia de los embriones (Vicente *et al.*, 2023) y cultivaron los embriones en HAM'S F10+20% suero homólogo de coneja.

Meryman (1966) fue el primero en atribuir un efecto protector a los polímeros de elevado peso molecular como el ficoll, atribuyéndoles la capacidad de prevenir el daño osmótico durante la vitrificación y de proporcionar protección a la membrana plasmática.

Los azúcares también ofrecen protección a la membrana, aunque contribuyen en gran medida al aumento de la osmolalidad del medio. Kuleshova *et al.* (1999) muestra el beneficio específico de los disacáridos, como la trehalosa, afirmando que estos tienen una gran influencia sobre las propiedades de los medios de vitrificación basados en etilenglicol. Atribuyendo este hecho a que al tener un mayor peso molecular ofrecen una menor osmolalidad total del medio de vitrificación, al requerir una menor concentración de crioprotectores (Liebermann *et al.*, 2003). En este experimento emplearon embriones de ratón en estadio de 2 células (24 horas) y unos medios suplementados por 5mM o 50mM de 6 azúcares distintos, entre ellos sacarosa y trehalosa, obteniendo unas viabilidades de 53 ± 26 y 50 ± 24 respectivamente. Los resultados obtenidos con el medio NEW muestran una mejoría de los resultados en este estadio ($0,73 \pm 0,069$).

Viudes de Castro y Vicente (1999) emplean un medio compuesto por DMSO (20% v/v) y EG (20% v/v) en DPBS suplementado con un 0,2% de BSA. Haciendo uso de este medio sobre embriones de 8-16 células obtienen un 71% de viabilidad la cual es menor a la obtenida con el medio NEW, con el que se obtiene un $0,88 \pm 0,044$.

Atendiendo a los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad con valores superiores al 60% de viabilidad, ambos medios podrían ser utilizados para la vitrificación de los tres estadios embrionarios objeto del estudio.

4.2. Valoración del desarrollo embrionario tras la vitrificación

Para la elaboración del estudio se empleó un total de 458 embriones.

Se valoró el desarrollo de los embriones de la misma manera que en el experimento anterior, evaluando su desarrollo a blastocisto a las 72, 48 y 24 horas tras la vitrificación los embriones de 24, 48 y 72 horas respectivamente. El total de embriones que alcanzó el estadio embrionario de blastocisto tras la incubación se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Efecto del estadio embrionario y el medio de vitrificación sobre viabilidad in vitro post-desvitrificación de embriones de conejo. (experimento 2).

Estadio	CONTROL	OLD	NEW	Total
24h	0,92 ± 0,039 (49)	0,10 ± 0,037 (63)	0,37 ± 0,058 (68)	0,47 ± 0,049 ^b (180)
48h	0,87 ± 0,051 (45)	0,10 ± 0,044 (48)	0,33 ± 0,068 (48)	0,42 ± 0,051 ^b (141)
72h	0,95 ± 0,034 (41)	0,63 ± 0,071 (46)	0,74 ± 0,062 (50)	0,81 ± 0,039 ^a (137)
Total	0,92 ± 0,025^A (135)	0,23 ± 0,038^B (157)	0,48 ± 0,041^C (166)	0,58 ± 0,030 (458)

OLD: (EQ) 10% DMSO+10% EtOH, (VIT) 20% DMSO + 20% EtOH; (DesVIT) 0,33M sacarosa

NEW: (EQ) 17% Ficoll + 0,5M trehalosa, (VIT) 17% Ficoll + 0,5M trehalosa + 12% DMSO + 20% EtOH; (DesVIT) 17% Ficoll + 0,5M trehalosa

ISM ± es: medias cuadradas ajustadas por mínimos cuadrados ± el error estándar de los datos

^{a, b}: valores en las columnas con diferentes superíndices difieren estadísticamente (P<0,05) por efecto del medio

^{A, B, C}: valores en las columnas con diferentes superíndices difieren estadísticamente (P<0,05) por efecto del estadio.

El tipo de medio y el estadio embrionario resultaron significativos, sin embargo; la interacción de ambos no resultó significativa (P<0,077), aunque debería tenerse en cuenta en futuros estudios.

Los resultados obtenidos, mostrados en la tabla 7, muestran una diferencia significativa entre la viabilidad in vitro de los embriones vitrificados en el medio OLD y NEW, siendo mayor la del último (0,23 ± 0,038 vs 0,48 ± 0,041, respectivamente). Esta mayor supervivencia es especialmente observable en los estadios tempranos, 24 y 48 horas, en las que se obtenían 0,10 ± 0,037 y 0,10 ± 0,044, respectivamente con el medio OLD mientras que con el medio NEW se obtienen 0,37 ± 0,058 y 0,33 ± 0,068, respectivamente. Comparando estos resultados con el Control (embriones frescos cultivados in vitro), la supervivencia es significativamente menor en cualquiera de los medios, confirmando que la vitrificación-desvitrificación produce daños mayores que la simple exposición de los embriones a los medios.

Los resultados obtenidos son mayores a todos los estudios realizados con el medio original y la variación de este, mostrando que la adición de los crioprotectores no permeables, ficoll y trehalosa, ofrecen beneficios en la vitrificación. Vicente y García-Ximénez (1994) tras desvitrificar mórulas obtuvieron una tasa de desarrollo a blastocisto tras 24h de cultivo de 27% y después de 48h del 66%. Mehaisen *et al.* (2005 y 2006) obtuvieron una viabilidad del 48% frente a un 74% en el presente estudio ($0,74 \pm 0,062$), alcanzando el control niveles similares en todos los estudios. Cabe resaltar que Kasai *et al.* (1992) lograron unas tasas de desarrollo cercanas al 97-100% aunque la viabilidad post-transferencia fue similar a la obtenida por Vicente y García-Ximénez (1994), respectivamente un 65% y un 59% de gazapos nacidos, a pesar de que la viabilidad *in vitro* fue muy superior en el trabajo de Kasai *et al.* (1992), como hemos comentado anteriormente (97-100% vs 27%).

Existen pocos estudios sobre vitrificación en conejo que hayan centrado su atención en los estadios tempranos. Smorag *et al.* (1989) evaluó la susceptibilidad de los diferentes estadios embrionarios a la vitrificación empleando un medio a base de propanodiol y glicerol, observando unas tasas de supervivencia nulas o bajas para los estadios embrionarios tempranos, un 0% en 2 células y un 23% en 8-16, mientras que las mórulas alcanzaban un 82%. Popelkova *et al.* (2009) y Viudes de Castro *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la adición de polímeros al medio de vitrificación como el ficoll y el dextrano sobre la vitrificación de embriones de 8-16 células, llegando a obtener hasta un 63% de embriones desarrollados a blastocisto, niveles superiores a los alcanzados en el presente estudio. Pobrablemente, al igual que en el presente trabajo, la utilización de polímeros aumenta la viscosidad y la temperatura de transición vítrea, permitiendo que la solución vitrifique, incluso cuando se reduce la concentración de los crioprotectores permeables más tóxicos como el DMSO, favoreciendo así la viabilidad de estos estadios embrionarios tempranos (Kuleshova *et al.*, 2001).

Atendiendo a los resultados obtenidos en el ensayo de vitrificación, el medio NEW mejora la viabilidad de los embriones tempranos, de 2 y 8-16 células, manteniendo la viabilidad en mórulas similar al medio OLD.

5. CONCLUSIÓN

5. CONCLUSIÓN

De los datos obtenidos en el presente estudio se puede concluir:

- La toxicidad del medio NEW es similar a la toxicidad del medio OLD empleado actualmente de manera convencional en la vitrificación.
- La vitrificación con el medio NEW mejora la supervivencia de los embriones vitrificados, sobre todo los embriones de estadios tempranos (24 y 48 horas), cumpliendo por lo tanto con el objetivo planteado en este trabajo de desarrollar un medio de vitrificación que mejore la supervivencia de esta clase de embriones

Será necesario realizar en un futuro un estudio de la viabilidad *in vivo* de los embriones vitrificados para evaluar los resultados obtenidos *in vitro* con el nuevo medio.

6. REFERENCIAS

- Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J., McDowell, A.W. (1984). Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature*, 308 (5954), 32-36
- 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. *Hum. Reprod.*, 4, 77-79
- Al-Hasani, S., Ozmen, B., Koutlaki, N., Schoepper, B., Diedrich, K., Schultze-Mosgau, A. (2007). Tres años de vitrificación rutinaria de cigotos humanos: ¿sigue siendo justo recomendar la congelación a velocidad lenta? *Reprod Biomed Online*, 4, 288 – 293
- Arav, A. (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, 81: 96-102.
- Badrzadeh, H., Najmabadi, S., Paymani, R., Macaso, T., Azadbadi, Z., Ahmady, A. (2010). Super cool X-1000 and Super cool Z-1000, two ice blockers, and their effect on vitrification/warming of mouse embryos. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 151: 70-71.
- Baudot, A., Alger, L., Boutron, P. (2000). Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, 40: 151-158.
- Besenfelder, U., & Brem, G. (1998). Tubal transfer of bovine embryos: a simple endoscopic method reducing long-term exposure of in vitro produced embryos. *Theriogenology*, 50(5), 739–745.
- Bunge, R.G., & Sherman, J.K. (1953). Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, 172(4382), 767–768.
- Camus, A., Clairaz, P., Ersham, A., Van Kappel, A.L., Savic, G., Staub, C. (2006). Principe de la vitrification: cinétiques comparatives. The comparison of the process of five different vitrification devices. *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité*, 34:737-745.
- Chen, C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 327, 884–886.
- Chen, S.U., Lien, Y.R., Cheng, Y.Y., Chen, H.F, Ho, H.N. & Yang, Y.S. (2001). Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves Good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reproduction*, 16:2350-2356.
- Chian, R.-C. (2010). Cryobiology: an overview, in: *Fertility Cryopreservation*. 1st Edition. Cambridge. Cambridge (United Kingdom), 1-9.
- Cobo, A., Los Santos, M.J., Castello, D., Gamiz, P., Campos, P., Remohi, J. (2012). Resultados de embriones vitrificados en etapa de escisión temprana y en etapa de blastocisto en un programa de criopreservación: evaluación de 3150 ciclos de calentamiento, *Fertil Steril*, 98; 1138 – 1146.
- Cortell, C., Vicente, J. S., Mocé, E., Marco-Jiménez, F., & Viudes De Castro, M. P. (2010). Efficiency of repeated in vivo oocyte and embryo recovery after rhFSH treatment in rabbits. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 45(1), 155–159.
- Denker, H. W. (2000). Structural dynamics and function of early embryonic coats. *Cells, tissues, organs*, 166(2), 180–207.

- Ebner, T., Vanderzwalmen, P., Shebl, O., Urdl, W., Moser, M., Zech, NH, et al., (2009). La morfología de los embriones de día 5 vitrificados/calentados predice las tasas de implantación, embarazo y nacidos vivos, *Reprod Biomed Online*, 19, 72 – 78
- Esaki, R., Ueda, H., Kurome, M., Hirakawa, K., Tomii, R., Yoshioka, H., Ushijima, H., Kuwayama, M., Nagashima, H. (2004). Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction*, 71:432---437.
- Evans, B.R. (1999). The prospect for international regulatory interventions in embryo transfer and reproductive technologies in the next century, *Theriogenology* 51 (1), 71-80,
- Fahy, G.M., Rall, W.F. (2007). “Vitrification: an overview,” in: *Vitrification in Assisted Reproduction*, M. J. Tucker and J. Liebermann, Eds., Informa Healthcare, London UK.
- Friedler, S., Giudice, L.C., & Lamb, E.J. (1988). Cryopreservation of embryos and ova. *Fertility and sterility*, 49(5), 743–764.
- 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, 485–492
- Gajda B., Smorag Z. (2009). Oocyte and embryo cryoprsvervation - state of art and recent developments in domestic animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18: 371-387
- Garcia-Dominguez, X., Marco-Jiménez, F., Viudes-de-Castro, M.P., Vicente, J.S. (2019). Minimally Invasive Embryo Transfer and EmbryoVitrification at the Optimal Embryo Stage in Rabbit Model. *J. Vis. Exp.* e58055.
- Goto, S., Kadowaki, T., Tanaka, S., Hashimoto, H., Shiotani, M., Kokeguchi, S. (2011). Predicción de la tasa de embarazo por puntuación morfológica y edad del blastocisto, basada en 1488 ciclos únicos de transferencia de blastocistos congelados y descongelados. *Fertilidad y Esterilidad*. 95 (3):948–952.
- Griesinger, G., von Otte, S., Schroer, A., Ludwig, A.K., Diedrich, K., Al-Hasani, S., et al. (2007). Elective cryopreservation of all pronuclear oocytes after GnRH agonist triggering of final oocyte maturation in patients at risk of developing OHSS: a prospective, observational proof-of-concept study, *Hum Reprod*, 22. 1348-1352
- Griveau, J.F., Lopes, M., Jouve, G., Veau, S., Ravel, C., & Morcel, K. (2015). La vitrification: principes et résultats [Vitrification: Principles and results]. *Journal de gynécologie, obstetrique et biologie de la reproduction*, 44(6), 485–495.
- Hamano, S., Koikeda, A., Kuwayama, M., & Nagai, T. (1992). Full-term development of in vitro-matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 38(6), 1085–1090.
- Hamawaki, A., Kuwayama, M., Hamano, S. (1999). Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology*, 51: 165 (abstract)
- 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.
- Holt, WV., Pickard, AR. (1999). Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. *Rev Reprod*. 4(3):143-50.

- Isachenko, V., Folch, J., Isachenko, E., Nawroth, F., Krivokharchenko A., Vajta, G., Dattena, M., Alabart, J.L. (2003). Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology*, 60: 445-452.
- 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. *Biol. Reprod.* 46, 1042-1046.
- Kasai, M., & Mukaida, T. (2004). Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproductive biomedicine online*, 9(2), 164–170.
- Kaartinen, N., Kananen, K., Huhtala, H., Keränen, S., Tinkanen, H. (2016). The freezing method of cleavage stage embryos has no impact on the weight of the newborns. *J Assist Reprod Genet.*;33(3):393-399.
- Konc, J., Kanyó, K., Kriston, R., Somoskői, B., Cseh, S. (2014). Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *Biomed Res Int.* 307268.
- 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.
- Kuleshova, L.L., Shaw, J.M., Trounson, A.O. (2001). Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 43:21-31.
- Kulíková, B., Jiménez-Trigos, E., Makarevich, A. V., Chrenek, P., Vicente, J. S., & Marco-Jiménez, F. (2016). State of actin cytoskeleton and development of slow-frozen and vitrified rabbit pronuclear zygotes. *Cryobiology*, 72(1), 14–20.
- Kuwayama, M., Hamano, S., & Nagai, T. (1992). Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, 96(1), 187–193.
- Kuwayama M., Vajta G., Ieda S., Kato O. (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination, *Reprod Biomed Online*, 11, 608-614
- Lane, M., Schoolcraft, W.B., Gardner, D.K., Phill, D. (1999). Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*, 72: 1073-1078.
- 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.
- Lavara, R., Baselga, M., Marco-Jiménez, F., & Vicente, J. S. (2015). Embryo vitrification in rabbits: Consequences for progeny growth. *Theriogenology*, 84(5), 674–680.
- Lee, D.R., Yang, Y.H., Eum, J.H., Seo, J.S., Ko, J.J., Chung, H.M, Yoon, T.K. (2007). Effect of using slush nitrogen (SN2) on development of microsurgically manipulated vitrified/warmed mouse embryos. *Human Reproduction*, 22: 2509-2514.

- Liebermann, J., Nawroth, F., Isachenko, V., Isachenko, E., Rahimi, G., & Tucker, M. J. (2002a). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of reproduction*, 67(6), 1671–1680.
- Liebermann, J., Tucker, M. J., Graham, J. R., Han, T., Davis, A., & Levy, M. J. (2002b). Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reproductive biomedicine online*, 4(2), 146–150.
- Liebermann, J., Diet, J., Vanderzwalmen, P., Tucker, M.J. (2003). Recent developments in human oocyte, embryo, and blastocyst vitrification: where are we now? *Reproductive Biomedicine On-line*, 7(6):623-633.
- Liebermann, J. (2009). Vitricación de blastocistos humanos: una actualización, *Reprod Bio-med Online*, 19, 4328
- Liehman P. (1991). Porovnání různých kryokonzervacních médií pro vitrifikaci sedmidenních embryí skotu [Comparison of various cryopreservation media for vitrification of 7-day bovine embryos]. *Veterinarni medicina*, 36(10), 585–592.
- Marco-Jiménez F., Vicente J.S., Lavara R., Balasch S., Viudes-de-Castro M.P. (2010). Poor prediction value of sperm head morphometry for fertility and litter size in rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, 45: 118–123.
- Marco-Jiménez, F., Berlinguer F., Leoni G.G., Succu S., Naitana S. (2012). Effect of “ice-blockers” in solutions for vitrification of in vitro matured ovine oocytes. *Cryoletters*, 33: 41-44.
- Marco-Jiménez F., López-Bejar M. (2013). Detection of glycosylated proteins in rabbit oviductal isthmus and uterine endometrium during early embryo development. *Reprod Domest Anim*. 48(6), 967-973.
- Marco-Jiménez, F., Jiménez-Trigos, E., Lavara, R., Vicente J.S. (2014). Generation of live offspring from vitrified embryos with synthetic polymers supercool X-1000 and supercool Z-1000. *CryoLetters* 35 (4), 286-292 (2014)
- Marco-Jiménez, F., Jiménez-Trigos, E., Almela-Miralles, V., y Vicente, JS. (2016). Development of Cheaper Embryo Vitrification Device Using the Minimum Volume Method. *PLoS One*. 11(2): e0148661.
- Marco-Jiménez, F., Garcia-Dominguez, X., García-Valero, L., Vicente, J.S. (2023). A 3D-Printed Large Holding Capacity Device for Minimum Volume Cooling Vitrification of Embryos in Prolific Livestock Species. *Animals* 13, 791.
- Martínez-Páramo, S., Barbosa, V., Pérez-Cerezales, S., Robles, V., & Herráez, M.P. (2009). Cryoprotective effects of antifreeze proteins delivered into zebrafish embryos. *Cryobiology*, 58(2), 128–133.
- Massip A., Mermillod P., Dinnyes A., (1995). Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implication for their cryopreservation. *Human Reproduction*, 10: 3004-3011.
- Mehaisen, G.M.K., Vicente, J.S., Lavara, R., Viudes-de-Castro, M.P. (2005). Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. *Animal Reproduction Science*, 90: 175-184.

- Mehaisen, G.M.K., Viudes-de-Castro, M.P., Vicente, J.S., Lavara, R. (2006). In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology*, 65: 1279-1291.
- Meryman, H.T. (1966). Review of biological freezing, en: *Cryobiology*. Ed. H.T. Meryman. New York:63.
- Mocé, E., Lavara, R., & Vicente, J. S. (2010). Effect of cooling rate to 5 °C, straw size and farm on fertilizing ability of cryopreserved rabbit sperm. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 45(5), e1–e7.
- Mochida, K., Hasegawa, A., Ming-wen, L., Fray, M.D., Kito, S., Vallelunga, J.M., Lloyd K.C.K., Yoshiki, A., Obata, Y., Ogura, A. (2013). High osmolality vitrification: A new method for the simple and temperature-permissive cryopreservation of mouse embryos. *PLoS ONE*, 8:e49316.
- Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Oka, C., Kasai, M., et al., (2003). Vitrificación de blastocistos humanos usando cryoloops: resultado clínico de 223 ciclos, *Hum Reprod*, 18, 384 - 391
- Murakami, H., Imai, H. (1996). Successful implantation of in vitro cultured rabbit embryos after uterine transfer: a role for mucin. *Mol. Reprod. Dev.* 43, 167–170
- Nkagata, N. (1989). High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *Journal of reproduction and fertility*, 87(2), 479–483.
- O'kearney-Flynn, M., Wade, M., Duffy, P., Gath, V., Boland, M.P., Dobrinsky, J.M. (1998). Effect of cryopreservation on IVP cattle embryos development in vitro and in vivo. *Theriogenology*, 49:178
- Parkening, T.A., Tsunoda, Y., Chang, M.C. (1976). Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J. Exp. Zool.* 197, 369–374.
- Pensis, M., Loumaye, E., & Psalti, I. (1989). Screening of conditions for rapid freezing of human oocytes: preliminary study toward their cryopreservation. *Fertility and sterility*, 52(5), 787–794.
- Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S. (1949). Reactivación de espermatozoides tras vitrificación y deshidratación a bajas temperaturas. *Naturaleza*. 164 :666.
- Popelková, M., Turanová, Z., Koprđová, L., Ostró, A., Toporcerová, S., Makarevich, A. V., & Chrenek, P. (2009). Effect of vitrification technique and assisted hatching on rabbit embryo developmental rate. *Zygote (Cambridge, England)*, 17(1), 57–61.
- Rall, W.F., Fahy, G.M. (1958). Criopreservación sin hielo de embriones de ratón a -196 °C mediante vitrificación. *nature* 313 (6003):573–575.
- Rama-Raju, G.A., Haranath, G.B., Krishna, K.M., Prakash, G.J., Madan, K. (2005). Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates, *Reprod Biomed Online*, 11, 434-437
- Ri-cheng, C. (2010). *Cryobiology: an overview*, en: *Fertility Cryopreservation*. Ed. Cambridge University Press. Cambridge, 1-9.

- Saragusty, J., Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141: 1-19.
- Saenz-de-Juano M.D., Marco-Jimenez F., Schmaltz-Panneau B., Jimenez-Trigos E., Viudes-de-Castro M.P., Peñaranda D.S., Jouneau L., Lecardonnell J., Lavara R., Naturil-Alfonso C., Duranthon V., Vicente J.S. (2014). Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. *Reproduction*, 147(6), 789–801.
- Sharma, R.S., Saxena, R., Singh, R. (2018). Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective. *Indian J Med Res.* 148:S10-S14.
- Shaw, J.M. AND Jones, G.M. (2003). Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 9:583-605.
- Smorag, Z., Gajda B., Wieczorek B., Jura J. (1989). Stage-dependent viability of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 31: 1227-1231.
- Stehlik, E., Stehlik, J., Katayama, K.P., Kuwayama, M., Jambor, V., Brohammer, R., et al. (2005). La vitrificación demuestra una mejora significativa frente a la congelación lenta de blastocistos humanos, *Reprod Biomed Online*, 11: 53 - 57
- Steponkus, P.L., Myers, S.P., Lynch, D.V., Gardner, L., Bronshteyn, V., Leibo, S.P., Rall, W.F., Pitt, R.E., Lin, T.T., Macintyre, R.J. (1990). Cryopreservation of *Drosophila melanogaster* embryos. *Nature*, 345: 170-172.
- Swain, J.E. and Smith, G.D. (2010). Cryoprotectants, in: *Fertility Cryopreservation*. 1st Edition. Cambridge. Cambridge (United Kingdom), 24-37.
- Takahashi, K., Mukaida, T., Goto, T., Oka, C. (2005). Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study, *Fertil Steril*, 84:88-92
- Trounson, A.O., y Mohr, L. (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 305 (5936): 707-9.
- Vajta, G., Holm, P., Greve, T., Callesen, H. (1997). Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 38:349-352.
- Vajta, G., Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65:236-244.
- Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Debauche, C., Standaart, V., Schoysman, E. (2000). “Invitro” survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Fertility and Sterility*, 74: S215-S216 (abstract).
- Vanderzwalmen, P., Ectors, F., Grobet, L., Prapas, Y., Panagiotidis, Y., Vanderzwalmen, S., et al. (2009). Vitrificación aséptica de blastocistos de pacientes infértiles, donantes de óvulos y después de MIV, *Reprod Biomed Online*, 19:700 - 707
- Van Landuyt, L., Verpoest, W., Verheyen, G., De Vos, A., Van de Velde, H., Liebaers, I., et al. (2011). Closed blastocyst vitrification of biopsied embryos: evaluation of 100 consecutive warming cycles, *Hum Reprod*, 26:316-322
- Vicente, J. S., García-Ximénez, F. (1994). Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. *Theriogenology*, 42, 1205-1215.

- 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.
- Vicente, J.S., Lavara, R., Marco, F., Viudes-de-Castro, M.P. (2011). Detrimental effect on availability of buserelin acetate administrated in seminal doses in rabbits. *Theriogenology*, 76:1120-1125.
- Vicente J.S., Marco-Jiménez F., Viudes-de-Castro M.P. (2012). Crioconservación de gametos y embriones, en: *Fundamentos Y Técnicas de la Reproducción*. 1a Edición. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, 85-103.
- Vicente, J. S., Saenz-de-Juano, M. D., Jiménez-Trigos, E., Viudes-de-Castro, M. P., Peñaranda, D. S., & Marco-Jiménez, F. (2013). Rabbit morula vitrification reduces early foetal growth and increases losses throughout gestation. *Cryobiology*, 67(3), 321–326.
- Viudes De Castro, M. P., Cortell, C., & Vicente, J. S. (2010). Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo. *Theriogenology*, 74(9), 1623–1628.
- Vutyavanich, T., Sreshthaputra, O., Mongkolchaipak, S., Wongtra-ngan, S., Piromlertamorn, W. (2008). Slow programmable and ultrarapid freezing of human embryos, *J Obstet Gynaecol Res*, 34:457-463
- Whittingham D.G., Leibo S.P., Mazur P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *Science*, 178: 411–414.
- Wilmot, I. (1972). The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci II*. 11(22): 1071-9.
- Wilmot, I. y Rowson, L.E.A. (2017). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973; 92; 686-90. Wong KM, Van Wely M, Mol F, Repping S y Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*; 3
- Yavin, S., Arav, A. (2001). Development of immature bovine oocytes vitrified by minimum drop size technique and a new vitrification apparatus (VIT-MASTER). *Cryobiology*, 43:331 (abstract).
- Zech, N.H., Lejeune, B., Zech, H., Vanderzwalmen, P. (2005). Vitrification of hatching and hatched human blastocysts: effect of an opening in the zona pellucida before vitrification, *Reprod Biomed Online*, 11:355-361