

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***VITRIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE MÓRULAS DE CONEJO EN ETILENGLICOL A -80°C Y A -196°C.***

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: CRISTINA CALOMARDE GONZÁLEZ

TUTOR/A: JOSÉ SALVADOR VICENTE ANTÓN

*Curso Académico: 2013-2014*

VALENCIA, JULIO 2014





**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA**



**Escuela Técnica Superior de Ingeniería  
Agronómica y del Medio Natural**

### Datos personales

Nombre y Apellidos: Cristina Calomarde González

### Datos del Trabajo Fin de Grado

Título de TFG:

Tutor: José Salvador Vicente Antón.

Localidad y Fecha: Valencia, julio de 2014.

### Palabras clave

Mórula, etilenglicol, vitrificación, conejo.

### Resumen

Desde que en los años 50 se demostrase la posibilidad de congelar y preservar con éxito células animales como espermatozoides, óvulos y embriones a  $-196^{\circ}\text{C}$ , la crioconservación ha sido una herramienta más al servicio de la Biomedicina y la Producción Animal. La finalidad de los procedimientos de crioconservación es el establecimiento de bancos criogénicos de células, tejidos y germoplasma, transformados o no, con el fin de preservar, conservar, gestionar o facilitar su difusión. La exportación de los embriones crioconservados por vía aérea viene realizándose en criobancos secos de nitrógeno ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), ya que su transporte y/o almacenamiento a temperaturas superiores puede ocasionar daños irreversibles en los embriones. Por ello, en este trabajo se evaluó la viabilidad de mórulas de conejo vitrificadas y almacenadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  en una solución de vitrificación compuesta por 42,5% (v/v) Etilenglicol, 18% (peso/v) Dextrano y 1,01 M Sacarosa.

Se utilizaron un total de 305 embriones, de dos líneas genéticas de conejo (A y V), de los que 85 fueron utilizados como controles, 105 como vitrificados y mantenidos a  $-196^{\circ}\text{C}$  y el resto (96) se vitrificaron y mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 15 días. Los resultados obtenidos para los

mantenidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  fueron negativos, ninguno de ellos sobrevivió a dicha temperatura. Sin embargo, la viabilidad *in vitro* e *in vivo* de los embriones mantenidos a  $-196^{\circ}\text{C}$  se encuentra dentro del rango obtenido en estudios anteriores sobre la vitrificación de embriones de conejo. Así, *in vitro* se observó una tasa de desarrollo a blastocisto del 47 al 93%, siendo favorable para la línea A frente a la línea V. El estudio *in vivo* realizado sobre la línea A mostró unas tasas de implantación y de nacimiento respectivamente del 60,8% y 51,9%, resultados similares a los obtenidos con embriones transferidos sin vitrificar (control).

### Key words

Morula, ethylene, vitrification, rabbit.

### Abstract

Since in the 50's it was demonstrated the possibility to successfully freeze and preserve animals cells as sperm, oocytes and embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$ , the cryoconservation has been an tool in habitual Biomedicine and Animal Production. The purpose of crioconservation procedures is the establishment of cryogenics cell, tissues and germplasm banks, transformed or not, in order to preserve, conserve, manage or facilitate their spreading. The export of cryopreserved embryos by plane, has been performed in dry shipper cryobanks ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) because their transport or storage at high temperatures can cause irreversible cell damage in the embryos. Thus, the aim of this work was to evaluate the viability of rabbit morulaes vitrified and storage at  $-196^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  in a vitrified solution containing 42.5% (v/v) Ethylene, 18% (weigh/v) Dextran and 1.01M Sucrose.

305 embryos were used from two genetics rabbit lines (A and V), 85 were used as fresh control, 105 as vitrified and stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  and the rest (96) were vitrified and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 15 days. The results obtained for the embryos stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  were negative, none of them survived at this temperature. However, the *in vitro* and *in vivo* viability of embryos stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  is between the range obtained in the previous studies about vitrified rabbit morulaes. Thereby, it was observed that the rate of *in vitro* embryo development was between 47 to 93%, being better for line A than for line V. The *in vivo* study performed on the line A showed that implantation and birth rates were 60.8 and 51.9 respectively, similar to results obtained for control embryos transferred (whitout vitrified).

## *Agradecimientos*

Gracias a Jose por brindarme la oportunidad de realizar el TFG en su laboratorio, poner a mi disposición su tiempo y conocimiento y tener una enorme paciencia con todos nosotros.

Gracias también a Paco, por luchar por unas prácticas externas llenas de obstáculos.

A Estrella, Mara, Carmen, Amparo y Luís gracias por ayudarme en todos esos momentos en los que yo sola no sabía por dónde seguir, por enseñarme cosas que no sabía y por aguantar la invasión del cuarto de escribir

A vosotras chicas, por esas comidas en la universidad llenas de problemas de asignaturas, nombres de profesores, pero sobre todo risas, más risas y mil historias que contar.

A Mati y Paula, por las noches de risas en el piso y esas cenas improvisadas.

A Miguel, Alba y Alejandro, por todas esas horas juntos en las que los trabajos se amontonaban y nos peleábamos por cosas como el diseño de un trabajo para luego reírnos sin parar.

Alba, gracias por todos los momentos, tanto de risa como de agobio, por tus maravillosos apuntes salvadores y por enseñarme a usar Power Point a nivel profesional.

Alejandro, gracias por estar ahí en muchos momentos, aunque en alguno nos hayamos querido tirar de los pelos pero al final siempre lo hemos solucionado.

Y por último, a las personas más importantes:

A mi hermana, por las tardes intentado estudiar en casa cuando tú no parabas de hablar y yo de reír o cuando yo estaba triste y hacías cualquier cosa para que sonriese.

A Javi, gracias por estar a mi lado en todo momento, por aguantarme cuando estaba agobiada en exámenes, por hacerme reír cuando yo era incapaz, por hacerme ver que la solución no era coger la maleta y volver a casa sino quedarme y luchar por lo que quería. Por quererme tal y como soy.

A ti mamá, por luchar por mi hermana y por mí, por estar a mi lado en todo momento fuera y dentro de la carrera, por apoyarme en las decisiones, por hacer de mi la persona que soy, y por un sinfín de cosas que no podrían escribirse ni en todas las hojas de este trabajo.

---

# ÍNDICES

---

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 BANCOS CRIOGÉNICOS PARA LA CONSERVACIÓN Y DIFUSIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMALES.....	1
1.1.1 Tipos De Germoplasmas Almacenables En Criobancos Para Animales De Granja.....	2
1.1.1.1 Semen.....	2
1.1.1.2 Ovocitos.....	3
1.1.1.3 Embriones.....	4
1.1.1.4 Ovarios.....	5
1.1.1.5 Células madre, células germinales primordiales y células somáticas.....	5
1.2 FUNDAMENTOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE CRIOCONSERVACIÓN Y EFECTOS SOBRE LOS EMBRIONES.....	5
1.2.1 Procedimientos De Crioconservación.....	5
1.2.2 Características De Los Crioprotectores Y Medios De Vitricación.....	8
1.2.3 Dispositivos de Vitricación.....	10
1.3 COMERCIO DE EMBRIONES ANIMALES.....	10

<b>2. OBJETIVO</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
3.1.1 Experimento 1. Valoración <i>In Vitro</i> De La Viabilidad De Mórulas De Conejo Vitrificadas En Medio HOVm Y Almacenadas A -80°C Y A -196°C Durante 15 Días.....	15
3.1.2 Experimento 2. Valoración <i>In Vivo</i> De La Viabilidad De Mórulas De Conejo Previamente Vitrificadas En Medio HOVm Y Almacenadas A -196°C Durante 15 Días.....	16
3.2 ANIMALES.....	17
3.3 RECUPERACIÓN DE EMBRIONES.....	17
3.3.1 Tratamiento De Sincronización.....	17
3.3.2 Inseminación Artificial.....	18
3.3.3 Obtención Y Catalogación De Los Embriones.....	18
3.4 MEDIO Y PROCEDIMIENTO DE VITRIFICACIÓN.....	19
3.5 DESVITRIFICACIÓN Y CULTIVO DE LOS EMBRIONES.....	20
3.6 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.....	21
3.7 VALORACIÓN DE EMBRIONES IMPLANTADOS.....	22
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	22
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
4.1 VALORACIÓN DE LOS EMBRIONES EN CULTIVO IN VITRO HASTA BLASTOCISTO.....	23

4.1.1 Valoración De Grupos Y Líneas.....	23
4.2 VALORACIÓN DE LOS EMBRIONES <i>IN VIVO</i> .....	25
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>27</b>
<b>6. REFERENCIAS</b>	<b>28</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA</b>	<b>PÁGINA</b>
TABLA 1. Resumen de la crioconservación de germoplasma para diferentes especies.....	2
TABLA 2. Ventajas de la vitrificación y factores que afectan a su efectividad.....	7
TABLA 3. Crioprotectores más utilizados en reproducción asistida para óvulos y embriones de distintas especies.....	8
TABLA 4. Supervivencia y desarrollo de embriones vitrificados de ratón almacenados en diferentes soluciones a -80°C entre 2 y 160 días.....	13
TABLA 5. Supervivencia y desarrollo de embriones vitrificados y almacenados a -80°C, para seis líneas de ratón, durante 48 horas.....	13
TABLA 6. Medios de equilibrio y vitrificación utilizados para la vitrificación de embriones.	20
TABLA 7. Supervivencia y desarrollo de embriones <i>in vitro</i> para los diferentes grupos establecidos.....	23
TABLA 8. Tasas de implantación, nacimientos y pesos de los gazapos a partir de embriones control y, vitrificados en medio HOVm y almacenados durante 15 días.....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>	<b>PÁGINA</b>
FIGURA 1. Tipos de bancos criogénicos.....	12
FIGURA 2. Esquema del protocolo seguido para la valoración <i>in vitro</i> de mórulas de conejo vitrificados en medio HOVm y almacenadas a -80°C y a -196°C.....	15
FIGURA 3. Esquema del protocolo seguido para la valoración <i>in vivo</i> de mórulas de conejo control y, vitrificadas en medio HOVm y almacenados a -196°C.....	16
FIGURA 4. Vagina artificial para recuperación de semen de conejo.....	18
FIGURA 5. Perfusión de oviducto de coneja con 5mL de DPBS y recogida de los embriones en una Placa Petri.....	19
FIGURA 6. Esquema seguido para la vitrificación de mórulas de conejo en medio HOVm...	20
FIGURA 7. Esquema seguido para la desvitrificación de mórulas de conejo.....	21
FIGURA 8. Cultivo de embriones.....	24

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

HOVm:	High Osmolarity Vitrification Modified (Vitrificación de elevada osmolaridad modificada)
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EG:	Etilenglicol
DPBS:	Tampón fosfato de Dulbecco

# *1. INTRODUCCIÓN*

**1.1 Bancos criogénicos para la conservación y difusión de recursos genéticos animales**

**1.2 Fundamentos de los procedimientos de crioconservación y efectos sobre los embriones**

**1.3 Comercio de embriones animales**

### 1.1 BANCOS CRIOGÉNICOS PARA LA CONSERVACIÓN Y DIFUSIÓN DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMALES

Desde que en los años 50 se demostrase la posibilidad de congelar y preservar con éxito células animales como espermatozoides, óvulos y embriones a  $-196^{\circ}\text{C}$ , la crioconservación ha sido una herramienta más al servicio de la Biomedicina y la Producción Animal. La finalidad de los procedimientos de crioconservación es el establecimiento de bancos criogénicos de células, tejidos y germoplasma, transformados o no, con el fin de preservar, conservar, gestionar o facilitar su difusión.

Los bancos criogénicos destinados a preservar el genoma de animales facilitan la conservación *ex situ* de la biodiversidad y, el mantenimiento y difusión de líneas seleccionadas, mutagénicas o transgénicas, a través, fundamentalmente, de la crioconservación de espermatozoides, óvulos y embriones. En todos estos casos, además del riesgo a perder este material biológico por epizootias u otros desastres, existe una imposibilidad tanto económica como de espacio para mantener *in situ* las razas, estirpes o líneas (Mochida *et al.*, 2013). Así, es habitual que cada país tenga un programa nacional de conservación de recursos genéticos animales en los que, al menos por línea, estirpe o raza, se almacenan 200 embriones y unas 3000 dosis seminales siguiendo las directrices de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). Por otra parte, en ganadería se estima que anualmente en el mundo se recogen y congelan unos 250 millones de dosis seminales de toros de alta calidad, por ejemplo en esta especie y en 2012 en Europa se obtuvieron 115906 embriones, de los que en torno al 60% fueron congelados para su comercialización (Thibier and Wagner, 2002; Kniijm, 2013).

En el campo de la Reproducción Asistida Humana es una práctica rutinaria la crioconservación de semen, tanto homólogo como de donante, de ovocitos y de embriones por si fuese necesario repetir o aplazar el tratamiento, evitando además costes por repetición en la obtención de gametos o en la obtención de embriones por FIV-ICSI y molestias a la paciente por la obtención de nuevos gametos. Además, asociados a tratamientos agresivos contra enfermedades como el cáncer son cada vez más frecuentes los bancos de tejidos ovárico y testicular (Paynter and Fuller, 2007; Dahlen *et al.*, 2014; Gunasheela *et al.*, 2014).

### 1.1.1 Tipos De Germoplasmas Almacenables En Criobancos Para Animales De Granja

En las últimas décadas, se han desarrollado protocolos y materiales específicos para la crioconservación de los distintos tipos de germoplasma (semén, embriones, ovocitos, tejidos ovárico y testicular, células primordiales, células madre y células somáticas) (Woelders *et al.*, 2012). La Tabla 1 recoge, a modo de resumen, los tipos de germoplasma que actualmente están siendo crioconservados para algunos de los animales en los que se está llevando a cabo este tipo de práctica.

Tabla 1. Resumen de la crioconservación de germoplasma para diferentes especies [Extraído de Mazur *et al.*, 2008].

Especie	Recopilador	Espermatozoides	Embriones	Ovocitos	Tejido Ovárico	Tejido Testicular	Células madre embrionarias
Ratón	John Critser	***	****	***	**	*	****
Rata	John Critser	**	****	*	**	**	0
Cerdo	Phillip Purdy	**	*	*	*	*	*
Primates no humanos	Catherine VandeVoort	**	**	*	0	**	***
Peces de acuario	Terrence Tiersch	***	0	0	0	0	0

\*\*\*\*Bueno, \*\*\* Aceptable, \*\*Poco aceptable, \* Desfavorable, 0 Nulo.

#### 1.1.1.1 Semen

Las técnicas de recogida y congelación de semen están bien establecidas para la mayor parte de las especies ganaderas y de laboratorio, siendo la eficacia final del proceso variable según la especie, estirpe e incluso individuo. Pero dado que su obtención es relativamente fácil y no afecta a la integridad de los machos, la eficiencia puede ser subsanada por el número de dosis obtenidas.

El semen obtenido también puede ser utilizado para reconstruir una línea, aunque serán necesarias al menos entre 4-7 generaciones de retrocruzamientos para restablecer el genotipo original, dependiendo del grado de restauración de la línea a la que se quiera llegar (Woelders *et al.*, 2012). Dos factores que determinan el resultado de la crioconservación de semen son, por un lado, la fisiología y bioquímica propia de los espermatozoides y por otro lado, el tracto anatómico de la hembra, ya que implica diferencias en el mecanismo del transporte

espermático a través del mismo (Holt, 2000a; Holt, 2000b). Además, la composición del plasma seminal y las especies oxígeno-reactivas son factores que también influyen en la supervivencia post-descongelación de los espermatozoides (Barbas and Mascarenhas, 2009). Estas diferencias entre especies determinan variaciones en los protocolos óptimos de crioconservación de semen. En general, las velocidades de enfriamiento y calentamiento son siempre moderadamente altas (15-60°C/min durante el enfriamiento y superiores a 200°C/min en el calentamiento). El descubrimiento del glicerol como crioprotector supuso una mejora para la crioconservación de semen. Los espermatozoides de rumiantes son crioconservados usando un medio con 4-8% de glicerol, siendo también óptimo este rango para primates. Sin embargo, otras especies como el cerdo, el ratón o el conejo no toleran bien estas concentraciones de glicerol. En estos casos, se han utilizado tanto medios con menores concentraciones de glicerol en combinación con aminas, glicoproteínas de origen vegetal, animal y/o carbohidratos, como la adición o sustitución del glicerol por otros crioprotectores permeables. Por ejemplo, el dimetilsulfóxido (DMSO) se ha utilizado con éxito tanto en conejos como en elefantes (Holt, 2000b; Vicente *et al.*, 2013; Saenz-de-Juano *et al.*, 2014).

### 1.1.1.2 Ovocitos

En este caso, la restauración de una línea perdida o genotipo por crioconservación de ovocitos no necesita retrocruzamientos, aunque es necesario el uso de semen (Woelders *et al.*, 2012). Además, evita los problemas éticos que supone la crioconservación de embriones (Heng, 2007). En humanos se ha visto que tras un protocolo de vitrificación de ovocitos y de congelación lenta para espermatozoides han nacido bebés sanos (Porcu and Venturoli, 2006; Cobo and Díaz, 2011). Aunque se tienen menos datos, se sabe que también funciona en animales como el ratón, el caballo, la vaca y el conejo, pero a diferencia de estas, existen otras especies como el porcino en las que la presencia del elevado contenido lipídico en los ovocitos los hace vulnerables a temperaturas por debajo de 15°C (Paynter and Fuller, 2007; Woelders *et al.*, 2012).

La crioconservación de ovocitos ha tenido un mayor éxito en caso de que éstos sean maduros, ya que el mayor problema de la crioconservación de ovocitos inmaduros es su capacidad para madurar *in vitro*. La maduración del ovocito involucra la comunicación entre el ovocito y las células del cúmulo, y ésta parece difícil de preservar (Paynter and Fuller, 2007).

### 1.1.1.3 Embriones

Otra alternativa para la conservación de la diversidad genética es la crioconservación de embriones. Es un método rápido y completo para restablecer una línea en tan solo una generación (Saragusty and Arav, 2011).

En los últimos años, el desarrollo de los medios y protocolos de vitrificación han permitido obtener resultados no sólo competitivos con los clásicos procedimientos de congelación sino además, mejorar las tasas de supervivencia en algunos estadios embrionarios y especie (Szell and Windsor, 1994; Beebe *et al.*, 2005; Sanchez-Orosio *et al.*, 2010; Arav, 2014). No existe un medio de vitrificación estándar común para todas las especies, pero sí, casi todos los medios de vitrificación utilizan etilenglicol, combinado por ejemplo a partes iguales con DMSO en el caso de embriones de vacuno, porcino o conejo, o medios con alrededor de un 40% de etilenglicol (EG) combinado con un 18% de Ficoll y valores entre 0,3 y 1,01 M de sacarosa (Kasai *et al.*, 1992; Mehaisen *et al.*, 2006; Sanchez-Orosio *et al.*, 2010; Marco-Jiménez *et al.*, 2013; Mochida *et al.*, 2013; Konc *et al.*, 2014).

Por otra parte, se ha demostrado que los procedimientos de crioconservación no son inocuos sobre aquellos embriones que sobreviven al proceso, observándose alteraciones en la expresión génica de transcritos relacionados con el desarrollo, el metabolismo oxidativo, el estrés y la apoptosis (Katkov *et al.*, 2006; Dhali *et al.*, 2007; Succu *et al.*, 2008; Vicente *et al.*, 2013). Así, en morulas de conejo vitrificadas se han podido observar efectos sobre el desarrollo de la placenta y el peso de los nacidos vivos e identificado además, diferencias tanto en el transcriptoma como en el proteoma de la placenta fetal de 24 días de desarrollo (Saenz-de-Juano *et al.*, 2014).

También se han realizado estudios sobre el posible daño que sufren los embriones al permanecer durante largos periodos de tiempo en nitrógeno líquido en los que se demuestra que los embriones pueden ser almacenados, al menos 15 años, sin que ello reduzca su tasa de supervivencia (Fogarty *et al.*, 2000; Glenister and Thornton, 2000; Quintans *et al.*, 2002; Salvetti *et al.*, 2007; Vicente *et al.*, 2011).

### 1.1.1.4 Ovarios

La crioconservación de tejido ovárico es útil para preservar la fertilidad de la mujer cuando ésta padece enfermedades malignas y desea conservar su fertilidad ante tratamientos quirúrgicos, radio y/o quimioterapia (Fabbri *et al.*, 2014). Por ello, podría ser otro camino alternativo para la conservación del genotipo de animales. La crioconservación de los ovarios, o más concretamente de corteza ovárica, permite obtener ovocitos que son usados posteriormente para tratamientos de FIV-ICSI. La corteza ovárica crioconservada de un hembra donante podría ser injertada en una hembra receptora para restablecer la fertilidad de dicho animal (Woelders *et al.*, 2012). Fabbri *et al.* (2014) han conseguido la crioconservación de ovarios mediante vitrificación con resultados satisfactorios.

### 1.1.1.5 Células madre, células germinales primordiales y células somáticas

Las células madre de espermatogonias constituyen la base para continuar la espermatogénesis pudiendo manipularse para mejorar la reproducción asistida o desarrollar animales transgénicos (Lee *et al.*, 2014). En teoría, podrían ser también trasplantadas en un animal receptor o en caso de humanos recurrir a autotrasplante tras recibir el paciente un tratamiento agresivo, recuperando el individuo la capacidad de producir espermatozoides (Goossens *et al.*, 2013). Las células somáticas también pueden ser usadas para producir embriones como fue demostrado con la oveja Dolly (Campbell *et al.*, 2007; Woelders *et al.*, 2012).

## 1.2 FUNDAMENTOS DE LOS PROCEDIMIENTOS DE CRIOCONSERVACIÓN Y EFECTOS SOBRE LOS EMBRIONES

La crioconservación de embriones es la opción más rápida cuando se trata de restaurar una línea, ya que es posible hacerlo en una sola generación.

### 1.2.1 Procedimientos De Crioconservación

La crioconservación de embriones, al igual que en otras células, debe evitar la formación letal de cristales intracelulares, la toxicidad asociada al efecto solución así como las sustancias

que se utilizan para reducir la formación de cristales (crioprotectores), la desorganización celular y modificaciones en la fisiología celular inducida por el enfriamiento y por los crioprotectores. Por ello, se han ensayado diversos procedimientos de crioconservación diferenciándose entre ellos en la velocidad de enfriamiento, la concentración y combinación de crioprotectores, y si la muestra alcanza el equilibrio osmótico durante el proceso. No obstante es posible establecer dos métodos básicos: congelación y vitrificación.

En 1971, Whittingham y colaboradores congelaron con éxito por primera vez embriones tempranos de ratón, utilizando como crioprotector DMSO y descendiendo lentamente la temperatura hasta  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de sumergir la muestra en nitrógeno líquido. Este tipo de procedimiento se fundamenta en el control del descenso de la temperatura desde  $20^{\circ}\text{C}$  hasta un entorno de  $-35^{\circ}\text{C}$  a una velocidad entre  $-0,3^{\circ}\text{C}$  a  $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (previa inducción de la formación de hielo a  $-7^{\circ}\text{C}$ ), permitiendo el flujo de agua desde el interior al exterior celular alcanzando el equilibrio osmótico cuando se congela el medio extracelular (Shaw and Jones, 2003). Esto permite reducir el contenido de agua intracelular sin producir daños irreversibles por estrés osmótico, además la utilización de concentraciones moderadas de crioprotectores permeables como el glicerol o el DMSO ayudan a reducir la formación letal de hielo intracelular, pudiendo sumergir las muestras en nitrógeno líquido desde  $-30$  a  $-35^{\circ}\text{C}$  para su conservación. Sin embargo, la congelación puede generar un efecto solución por concentración de electrolitos debido a la deshidratación progresiva que genera la congelación del medio exterior (Pegg, 2007). Además, los ovocitos y embriones en estadios tempranos son más sensibles al enfriamiento, ya que éste provoca daños derivados de los cambios en la fluidez de la membrana y descenso de la permeabilidad de la misma (Vajta and Kuwayama, 2006; Gajda and Smorag, 2009).

La dependencia de este método de la utilización de congeladores programables de alcohol o nitrógeno, y los pobres resultados alcanzados para óvulos y algunos tipos de embriones han llevado al desarrollo de procedimientos de crioconservación alternativos. Éstos, están basados en medios con mayores concentraciones de crioprotectores permeables en combinación con crioprotectores no permeables, como la sacarosa o trehalosa, que provocan la deshidratación celular a temperaturas supracero para posteriormente depositar rápidamente las muestras a  $-196^{\circ}\text{C}$ , provocando una ultracongelación o incluso una vitrificación de la misma sin la necesidad de equipos de congelación programables.

## 1. INTRODUCCIÓN

La vitrificación surgió, por tanto, como una alternativa a los procedimientos de congelación (Rall and Fahy, 1985). Este método se basa en la utilización de elevadas concentraciones de crioprotectores para obtener un medio de elevada viscosidad que solidifique sin la formación de cristales de hielo (estado vítreo), sin embargo, las células se ven sometidas a un elevado estrés osmótico y a la posible toxicidad de los medios de vitrificación durante su adición y durante su eliminación. En general es un procedimiento más económico y rápido y ha sido eficaz en la crioconservación de ovocitos y embriones de diferentes especies (Bagis *et al.*, 2005; Kuwayama, 2007; Sanchez-Orosio *et al.*, 2010). La Tabla 2 recoge las ventajas de la vitrificación y los diversos factores que reducen su efectividad.

Tabla 2. Ventajas de la vitrificación y factores que afectan a su efectividad [Extraída de Liebermann *et al.*, 2002].

Ventajas de la vitrificación	Variables de la vitrificación que disminuyen su efectividad
Contacto directo de la muestra con el nitrógeno líquido.	Tipo y concentración de crioprotectores.
No hay cristales de hielo.	Temperatura de la solución de vitrificación.
Bajo tiempo de exposición a los crioprotectores.	Tiempo de exposición de las células/tejidos a la solución de vitrificación antes de introducir la muestra en nitrógeno líquido.
Rápida vitrificación y desvitrificación.	Volumen de crioprotector que recubre la muestra.
Pequeño volumen.	Dispositivo usado para la vitrificación.
Ratio de enfriamiento 15.000 a 30.000°C/min.	Habilidad del embriólogo.
Mínimos daños osmóticos.	Calidad y estado de desarrollo de la muestra.
Protocolo simple.	Calidad del nitrógeno líquido (esterilizado o no).
Eliminación del coste de los equipos programables y su mantenimiento.	

Por lo citado en la Tabla 2, los protocolos que se han desarrollado hasta el momento para la vitrificación de ovocitos y embriones tienen en cuenta las siguientes consideraciones: velocidad de congelación y descongelación, viscosidad del medio, volumen en el que van a ser crioconservados tanto ovocitos como embriones y el sistema de almacenamiento en el que van a ser vitrificados (Arav, 2014).

### 1.2.2 Características De Los Crioprotectores Y Medios De Vitrificación

Los crioprotectores se encuentran clasificados como muestra la Tabla 3 en permeables y no permeables:

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
<b>PERMEABLES</b>		
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
<b>NO PERMEABLES</b>		
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, vaca, oveja
Ácido hialurónico	Embriones	Ratón, vaca, oveja, cerdo

**Crioprotectores permeables:** son generalmente compuestos de bajo peso molecular, no iónicos con una elevada solubilidad en agua a bajas temperaturas difundiendo a través de las membranas celulares reemplazando el agua intracelular. La temperatura de exposición y la concentración a la que se encuentran son los determinantes de su toxicidad que puede verse reducida por la combinación de crioprotectores (Arav, 2014). Los más habituales son el DMSO, el propilenglicol (PROH), el etilenglicol y el glicerol (Chian, 2010; Vicente *et al.*, 2012).

El DMSO presenta una elevada toxicidad y suele combinarse con compuestos glicólicos como el propilenglicol o el etilenglicol menos tóxicos y con tendencia a estabilizar los sólidos vítreos resultantes del proceso de vitrificación (Shaw and Jones, 2003).

**Crioprotectores impermeables:** son polímeros demasiado grandes para difundir a través de la pared celular por lo que actúan desde el exterior celular aumentando la concentración en el exterior (aumento de la osmolaridad) favoreciendo la deshidratación celular. La mayor parte de este tipo de crioprotectores son disacáridos como la sacarosa, la trehalosa y la lactosa o polisacáridos como el dextrano o el ficoll, aunque también existen otros de naturaleza no glucídica como la polivinilpirrolidona (PVP). Todos ellos se combinan normalmente con algún crioprotector permeable (Chian, 2010; Vicente *et al.*, 2012).

En general, los medios o soluciones de vitrificación utilizan concentraciones superiores al 30% en volumen de crioprotectores permeables (5 a 7 M) frente al 10% de los procedimientos clásicos de congelación (en torno al 1,5M). En el caso de azúcares no permeables el rango varía entre 0,1 y 1M. Cuanto mayor es la concentración final de crioprotectores, mayor es la temperatura de transición vítrea disminuyendo la probabilidad de nucleación de hielo y su cristalización (Shaw y Jones, 2003).

Existen diferentes posibilidades para reducir la concentración y la toxicidad inherente de los crioprotectores permeables como son la aplicación de presión hidrostática, que produce un aumento de la temperatura de transición vítrea; el descenso de la temperatura de adición, la utilización de polímeros o agentes no permeables como ficoll, dextrano o polivinilpirrolidona que incrementan la viscosidad; y por último, la combinación de diferentes crioprotectores, ya que la reducción de la concentración parcial de cada uno de ellos contribuye a elaborar mezclas menos tóxicas. Las combinaciones más comunes son DMSO y etilenglicol y, de etilenglicol y propilenglicol (Chian, 2010; Quinn, 2010).

Además de los crioprotectores, existen otras sustancias que, a muy bajas concentraciones, son capaces de evitar la formación de hielo durante la crioconservación, son los llamados “ice-blockers”. Éstos, se unen a núcleos de cristalización impidiendo su crecimiento. Algunos como el polivinilalcohol (X-1000), las proteínas anticongelantes o AFPs (de las siglas en inglés Antifreeze Protein) y Z-1000 han sido probados y se ha visto que mejoran los resultados tras la desvitrificación de ovocitos y embriones (Martínez-Páramo *et al.*, 2008; Badrzadeh *et al.*, 2010; Marco-Jiménez *et al.*, 2012).

### 1.2.3 Dispositivos De Vitrificación

Como la probabilidad de vitrificación aumenta cuanto menor sea el volumen debido a que se facilita la transferencia de calor, se han desarrollado diferentes dispositivos con el objetivo de reducir el volumen de almacenamiento de las muestras (Arav, 2014). Estos dispositivos de almacenaje varían tanto el volumen del contenedor como el diseño del mismo. Existen dispositivos que permiten almacenar desde el embrión aislado (cryotop, cryoloop, superficie sólida, microgota, rejillas de microscopía electrónica y malla de nylon), a un volumen de 0,125mL, 0,25mL y 0,5mL de muestra en caso de vitrificación o congelación de ovocitos, embriones y semen utilizando pajuelas (OPS) y cryotips, hasta dispositivos de almacenaje que permiten contener 1 ó 2mL de muestra (semen) (Kuwayama, 2007; Gajda and Smorag, 2009; Saragusty and Arav, 2011; Arav, 2014). Además, la reducción del volumen supone la reducción del daño sufrido por los ovocitos y embriones en los momentos en los que afecta la concentración de crioprotector (tiempo que transcurre entre la colocación de los ovocitos o embriones en la pajuela e introducción en nitrógeno líquido y tiempo que transcurre tras la desvitrificación y hasta el lavado para la rehidratación de los embriones (Arav, 2014).

### 1.3 COMERCIO DE EMBRIONES ANIMALES

El comercio internacional de embriones crioconservados frente al de animales supone una serie de ventajas asociadas: menor riesgo de transmisión de enfermedades, reducidos costes de cuarentena, la posibilidad de seleccionar un animal a partir de una gran base genética, la posibilidad de retener los genes de interés de los animales seleccionados en el país exportador y la habilidad de adaptación de los animales al nuevo entorno, además de una importante reducción de costes (Mapletof and Hasler, 2005).

Según la Directiva 92/65/CEE del Consejo de 13 de julio de 1992, por la que se establecen las condiciones sanitarias aplicables a los intercambios y las importaciones en la comunidad europea de animales, esperma, óvulos y embriones, con respecto a estas condiciones, por ejemplo la normativa comunitaria específica para lagomorfos (sección I del Anexo A de la Directiva 90/425/CEE, cita en su Artículo 9) dice que:

“Los estados miembros velarán por que sólo se intercambien lagomorfos que cumplan los requisitos siguientes:

- a) no proceder de una explotación ni haber estado en contacto con animales de una explotación en la que haya aparecido la rabia o se haya supuesto aparición durante el último mes;
- b) proceder de una explotación en la que ningún animal presente síntomas de mixomatosis.”

El Capítulo III de la Directiva 92/65/CEE haciendo referencia a los requisitos relativos al esperma, óvulos y los embriones describe de qué manera deben de recogerse, tratarse, lavarse y conservarse este tipo de material biológico.

Cuando se produce el comercio internacional de embriones, éstos al ser material biológico y a la vez estar catalogado como mercancía peligrosa debido a que se transportan inmersos en nitrógeno líquido, requieren de un embalaje reglamentado. La IATA (Asociación Internacional de Transporte Aéreo) dispone de una reglamentación para el transporte de material peligroso y por el cual se va a regir y transportar este tipo de material. Existen tanto requerimientos generales como requerimientos específicos atendiendo al tipo de estado del material, si es sólido o líquido. Los requerimientos generales indican que los embalajes deben ser de buena calidad, lo suficientemente fuertes para soportar los choques que se producen normalmente durante el transporte; así como contruidos y cerrados de tal forma que prevengan cualquier pérdida del contenido que pudiera ocasionarse bajo las condiciones normales del transporte por las vibraciones, cambios de temperatura, humedad o presión. El embalaje debe estar compuesto de tres componentes como son: un recipiente primario, un embalaje secundario y un embalaje exterior rígido. Los recipientes primarios deben ser embalados en embalajes secundarios para que en las condiciones normales del transporte no puedan quebrarse, pincharse o filtrar el contenido al embalaje secundario. A su vez, los embalajes secundarios deben ir dentro de un embalaje exterior rígido (embalaje terciario)

Puesto que la muestra a transportar son embriones crioconservados en nitrógeno líquido, y el uso de éste en el embalaje está prohibido por el reglamento de mercancías peligrosas de la IATA, solo es posible transportar embriones crioconservados en bancos secos de nitrógeno, lo que encarece y dificulta su transporte. Estos bancos tienen una estructura similar a los criogénicos, son recipientes de aluminio multicapa con vacío entre ellas, pero en su interior disponen de una resina que retiene el nitrógeno líquido y evita que éste sea vertido en caso de vuelco (Figura 1).



Figura 1. Tipos de bancos criogénicos. (A, B y C) Banco seco de nitrógeno para transporte. (D) Banco de trabajo o frasco Dewar. (E) Banco de almacenamiento de muestras.

El mantenimiento de embriones crioconservados a una temperatura mayor a la que están sometidos actualmente para su transporte, permitiría la sustitución del nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) por hielo seco ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) disminuyendo tanto el coste del material refrigerante como el coste del embalaje y su posterior transporte, reduciendo a la vez el peligro que supone el transporte de nitrógeno. El transporte de embriones en hielo seco ha sido estudiado por Mochida *et al.* (2013) para embriones de 2 células en ratón, determinando un medio óptimo de vitrificación llamado HOV (high osmolarity vitrification), para dicho modelo animal que contenía entre un 40 y 45% de Etilenglicol, 18% Ficoll y 1,01 M Sacarosa, para un tiempo de almacenaje de al menos 30 días (Tablas 4 y 5).

Este procedimiento se ha desarrollado utilizando embriones de dos células de ratón, por lo que los resultados obtenidos con este modelo animal pueden no ser extrapolables al resto de animales o incluso no servir para estadios embrionarios más avanzados en el ratón ya que el desarrollo embrionario de todas las especies no siempre se ve alterado por los mismos factores y dentro de cada una, en cada línea y estadio embrionario. Esto hace necesario un estudio para aquellos animales en los que se quiera utilizar este tipo de transporte, ya que se estima que los costes se reducen a la mitad o un cuarto de los costes habituales del transporte en tanques secos de nitrógeno (Mochida *et al.*, 2013).

## 1. INTRODUCCIÓN

Tabla 4. Supervivencia y desarrollo de embriones vitrificados de ratón almacenados en diferentes soluciones a -80°C entre 2 y 160 días [Extraído de Mochida *et al.*, 2013].

Porcentaje de etilenglicol (v/v)	Concentración sacarosa (M)	Tiempo de almacenamiento a -80°C	Vitrificados	Recuperados* (%)	Vivos (%)	Cantidad de embriones en cultivo que llegan a mórula
42,5	1,006	2	60	57 (95)	57 (100)	51 (100)
		7	60	60 (100)	60 (100)	58 (97)
		30	60	60 (100)	46 (77)	42 (91)
45	0,825	2	60	59 (98)	58 (98)	51 (91)
		7	60	58 (97)	54 (93)	51 (94)
		30	60	58 (97)	48 (83)	46 (96)
		60	60	59 (98)	34 (58)	**
		160	60	49 (98)	26 (53)	**
50	0,75	2	60	60 (100)	48 (80)	35 (73)
		7	60	59 (98)	13 (22)	9 (69)

\* Los embriones “Recuperados” son todos los obtenidos tras la desvitrificación y los “Vivos” los recuperados vivos postdesvitrificación.

\*\*Embriones de 2 células que sobrevivieron fueron transferidos a una hembra receptora.

Tabla 5. Supervivencia y desarrollo de embriones vitrificados y almacenados a -80°C para seis líneas de ratón durante 48 horas [Extraído de Mochida *et al.*, 2013].

Cepa	Vitrificados	Recuperados (%)*	Vivos (%)**	Nº hembras gestantes (%)	Transferidos	Implantados (%)	Desarrollo de la descendencia (%)
C57BL/6J	265	263 (99)	256 (97)	3/3 (100)	39	36 (92)	32 (82)
C57BL/6N	175	173 (99)	168 (97)	3/3 (100)	40	36 (90)	21 (53)
BALB/cA	210	210 (100)	206 (98)	3/3 (100)	40	31 (78)	18 (45)
129/SvJ	100	100 (100)	93 (93)	3/3 (100)	41	33 (80)	27 (66)
DBA/2N	200	200 (100)	193 (97)	6/6 (100)	77	44 (57)	25 (32)
C3H/HeN	100	99 (99)	96 (97)	3/3 (100)	41	27 (66)	19 (46)

\*Recuperados: número de embriones obtenidos postdesvitrificación.

\*\*Vivos: número de embriones vivos postdesvitrificación.

## *2. OBJETIVO*

## 2. OBJETIVO

---

En este trabajo se estudia la viabilidad de mórulas de conejo vitrificadas y almacenadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$  en una solución de vitrificación compuesta por 42,5% (v/v) Etilenglicol, 18% (peso/v) Dextrano y 1,01 M Sacarosa, llamada en adelante HOVm.

## *3. MATERIAL Y MÉTODOS*

**3.1. Diseño experimental**

**3.2. Animales**

**3.3. Recuperación de embriones**

**3.4. Medio y procedimiento de vitrificación**

**3.5. Desvitrificación y cultivo de los embriones**

**3.6. Transferencia de embriones**

**3.7. Valoración de embriones implantados**

**3.8. Análisis estadístico**

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1.1 Experimento 1: Valoración *In Vitro* De La Viabilidad De Mórulas De Conejo Vitrificadas En Medio HOVm Y Almacenadas A -80°C Y A -196°C Durante 15 Días

La Figura 2 muestra un esquema del proceso que se siguió para desarrollar el estudio, aplicando el mismo proceso a cada una de las líneas de conejo seleccionadas, siendo éstas líneas A y V.

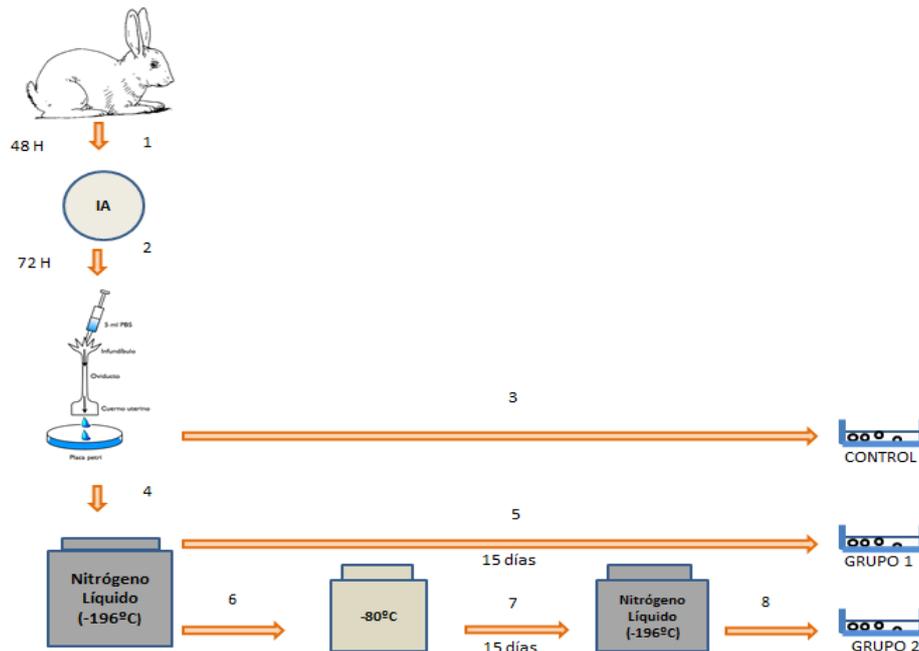


Figura 2. Esquema del protocolo seguido para la valoración *in vitro* de mórulas de conejo control y, vitrificadas en medio HOVm y almacenadas a -196°C. (1) Tratamiento de sincronización, (IA) Inseminación artificial y recuperación de los embriones mediante perfusión (2). (3) Cultivo de embriones control (Control). (4) Vitrificación del resto de embriones. (5) Embriones mantenidos a -196°C durante 15 días, desvitrificación y cultivo, usándose como controles de los vitrificados (Grupo 1). (6) Embriones vitrificados que pasaron a -80°C donde fueron almacenados durante 15 días (7) tras los cuales se sumergieron en nitrógeno líquido antes de ser desvitrificados y puestos a cultivar (Grupo 2) (8).

Las conejas fueron sometidas a un tratamiento de sincronización 48 horas antes de la inseminación artificial (IA) (1). Pasadas 72 horas, se sacrificaron las hembras para la obtención de los embriones mediante perfusión de los oviductos y úteros (2); los embriones recuperados fueron catalogados y seleccionados en base a criterios morfológicos, los seleccionados como morfológicamente normales fueron agrupados obteniendo un conjunto de embriones de varias conejas. De estos, un grupo de embriones fueron puestos en cultivo y utilizados como controles (CONTROL) (3). El resto de embriones fueron vitrificados y separados en dos grupos (4):

GRUPO 1 (controles vitrificados): embriones almacenados a  $-196^{\circ}\text{C}$  durante 15 días (5).

GRUPO 2: embriones almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 15 días tras la vitrificación (6 y 7).

Pasados 15 días, los embriones del grupo 2 fueron sumergidos de nuevo en nitrógeno líquido antes de ser desvitrificados (7). A continuación, se desvitrificaron los embriones correspondientes a los dos grupos identificando el grupo al que pertenecían para su posterior valoración (8).

Como se ha mencionado anteriormente, este procedimiento fue el mismo para cada una de las líneas de conejo elegidas, obteniendo por tanto tres grupos para cada línea: Control, Grupo 1 y Grupo 2.

### 3.1.2 Experimento 2: Valoración *In Vivo* De La Viabilidad De Mórulas De Conejo Previamente Vitrificadas En Medio HOVm Y Almacenadas A $-196^{\circ}\text{C}$ Durante 15 Días

Para probar la viabilidad *in vivo* fue necesario realizar transferencia embrionaria según muestra el protocolo seguido reflejado en la Figura 3. En este ensayo solo fueron transferidos embriones de la línea A.

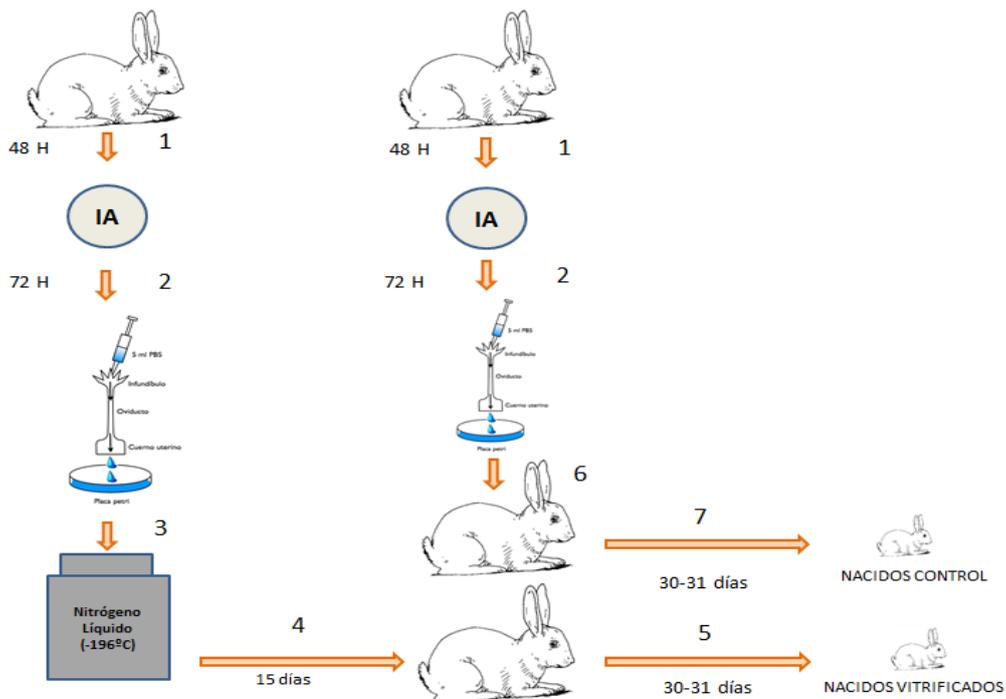


Figura 3. Esquema del protocolo seguido para la valoración *in vivo* de embriones control y vitrificados en medio HOVm y almacenados a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Tratamiento de sincronización (1), Inseminación artificial (IA) y recuperación de los embriones mediante perfusión (2). Vitrificación (3) y transferencia de embriones desvitrificados (4). Trasferencia de embriones control (6). Periodo de gestación y nacimiento de los gazapos nacidos de embriones vitrificados (NACIDOS VITRIFICADOS) (5) y control (NACIDOS CONTROL) (7).

El protocolo seguido fue el mismo que para la valoración *in vitro* hasta la obtención y catalogación de los embriones, con una diferencia de 15 días para hacer coincidir el día de las transferencias para los embriones control y vitrificados: (1) tratamiento de sincronización, inseminación artificial (IA), (2) recuperación de embriones mediante perfusión de los oviductos y úteros, catalogación y selección en base a criterios morfológicos, realizándose un conjunto de los mismos (2). Los embriones transferencias como embriones control (3) y el resto para vitrificación (4) y posteriormente transferidos (5). La gestación de las conejas duró entre 30-31 días, tras los cuales se obtuvieron gazapos nacidos de embriones vitrificados (NACIDOS VITRIFICADOS) (6) y de embriones control (NACIDOS CONTROL) (7).

## 3.2 ANIMALES

En este estudio se emplearon un total de 53 hembras de conejo de 5 meses de edad, correspondientes a las líneas de conejo A y V del Grupo de Mejora Animal del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia.

### Línea A

Creada en 1976 con conejos de origen neozelandés (NWZ) y seleccionados desde entonces por índice de selección familiar para el carácter tamaño de camada (Estany *et al.*, 1989). Actualmente se encuentra en la generación 43.

### Línea V

Fue creada en 1981 como una línea artificial mediante el cruce de cuatro líneas maternas especiales. Desde el momento de su creación han sido seleccionados por el índice de selección familiar para el carácter tamaño de camada (Estany *et al.*, 1989). Actualmente se encuentra en la generación 39.

## 3.3 RECUPERACIÓN DE EMBRIONES

### 3.3.1 Tratamiento De Sincronización

Las conejas fueron sometidas a un tratamiento de sincronización con 20 UI de eCG inyectada por vía subcutánea (Folligon® 1000 UI Intervet Schering-Plough Animal Health) 48 horas antes de su inseminación e inducción de la ovulación.

#### 3.3.2 Inseminación Artificial

La recogida del semen se llevó a cabo utilizando una vagina artificial con un tubo colector acoplado como muestra la Figura 4. Tras la recogida, se valoró la motilidad espermática, a temperatura ambiente, mediante microscopio óptico de contraste de fases a 40X. Se realizó una mezcla de 3 eyaculados de machos diferentes de la misma línea que presentaban una motilidad mayor del 70% y una tasa de anormales inferior al 25%, ajustando la concentración a  $40 \times 10^6$ /mL con un diluyente de semen de conejo (0,25M tris hidroximetil aminometano, 0,08M ácido cítrico, 0,05M glucosa y antibióticos (Marco-Jiménez *et al.*, 2010).



Figura 4. Vagina artificial para recuperación de semen de conejo.

Las hembras receptoras (previamente sometidas al tratamiento de sincronización citado en el punto 3.3.1) fueron inseminadas, cada una, con 0,5mL del de semen fresco. Tras la inseminación, se indujo la ovulación con una inyección intramuscular de 1 $\mu$ g de Acetato de Buserelina (Suprefact, Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, España), análogo de GnRH que provoca una simulación de la liberación hipotalámica de la GnRH endógena.

#### 3.3.3 Obtención Y Catalogación De Los Embriones

A las 70-72 horas post-inseminación se sacrificaron las hembras con 2mL de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol especialidades veterinaria, S.A., Vétouinol, Madrid, España). La recuperación de embriones se realizó a temperatura ambiente mediante la perfusión de los oviductos con 5mL por oviducto (Figura 5), de DPBS (Dulbeccos Phosphate-Buffered Saline, Sigma, Alcobendas, Madrid, España) suplementado con 0,2% (w/v) albúmina bovina (BSA;

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Sigma), y antibióticos (penicilina G sódica 300000 IU, penicilina G procaína 700000 IU y sulfato de dihidrostreptomina 1250 mg; Penivet 1; Divasa Farmavic, Barcelona, España).



Figura 5. Perfusión de oviducto de coneja con 5mL de DPBS y recogida de los embriones en una Placa Petri.

El medio de perfusión fue recogido en Placas Petri donde se recuperaron, lavaron y catalogaron los embriones. La catalogación de los embriones se basó en criterios morfológicos como el aspecto de la zona pelúcida, la cubierta de mucina, la homogeneidad del citoplasma, el tamaño regular de las células de los embriones y la correspondencia con el estadio esperado, en este caso mórula. Los embriones ideales son aquellos compactos y esféricos con unas blastómeras del mismo tamaño, color y textura, además de presentar un citoplasma no granuloso ni con vesículas y un espacio perivitelino claro y sin restos celulares.

#### 3.4 MEDIO Y PROCEDIMIENTO DE VITRIFICACIÓN

El objetivo del presente trabajo era comprobar si un medio y protocolo de vitrificación similar al descrito por Mochida *et al.* (2013) son utilizables para el banco de embriones de líneas seleccionadas de conejo de la Universidad Politécnica de Valencia. De esta manera, las soluciones de equilibrio y vitrificación utilizadas fueron las definidas en la Tabla 6, utilizando como dispositivo de almacenamiento pajuelas en vez de los crioviales utilizados en ratón.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 6. Medios de equilibrio y vitrificación utilizados para la vitrificación de embriones.

Solución equilibrio	Solución de vitrificación
5% (v/v) DMSO	42,5% (v/v) EG
5% (v/v) EG- DPBS	18% (peso/v) Dextrano
	1,01M Sacarosa en DPBS

Una vez definidas las soluciones de equilibrio y vitrificación, en la Figura 6 se muestra el procedimiento que se siguió para llevar a cabo la vitrificación de todos los embriones. Todo el proceso fue realizado a temperatura ambiente.

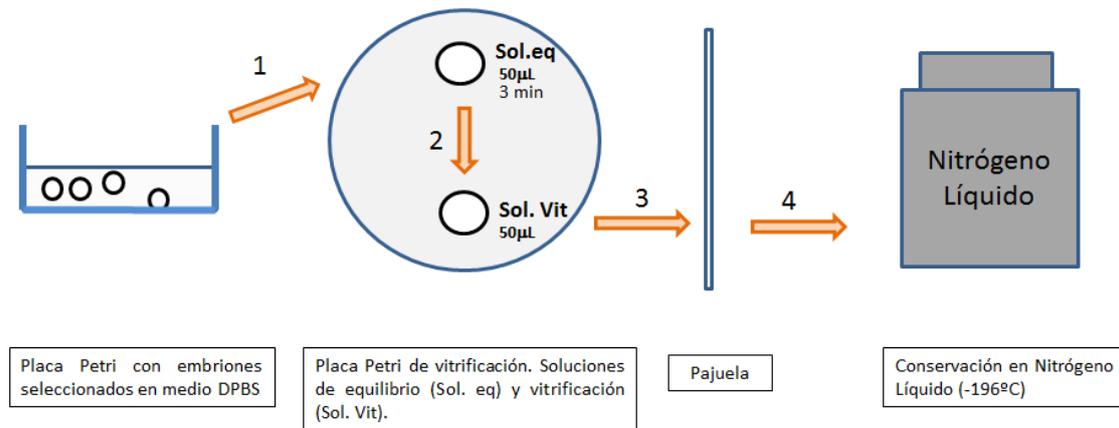


Figura 6. Esquema seguido para la vitrificación de mórulas de conejo en medio HOVm. Los embriones seleccionados y lavados en DPBS se colocaron en 50 µL de solución de equilibrio (1). Pasados 3 minutos se colocaron en 50 µL de solución de vitrificación (2). Rápidamente se introdujeron los 50 µL de solución de vitrificación con los embriones en una pajuela (3) que se introdujo en nitrógeno líquido (4).

Los embriones se pasaron del medio DPBS a una gota de 50µL de solución de equilibrio (cogiendo el menor volumen posible de medio para evitar distorsionar la solución de equilibrio) en la que permanecieron tres minutos. A continuación se pasaron a una gota de 50µL de solución de vitrificación (2). Rápidamente, se introdujeron los 50µL de la solución de vitrificación con los embriones en una pajuela de 0,125ml (plastic straw, IVM, l'Aigle, France) (3), se colocó el tapón y se introdujo en nitrógeno líquido (4).

#### 3.5 DESVITRIFICACIÓN Y CULTIVO DE LOS EMBRIONES

Para la desvitrificación de los embriones, tanto los almacenados a -196°C como a -80°C, también se utilizaron las soluciones de Mochida *et al.* (2013) para el proceso citado, haciendo pequeñas modificaciones ya que la vitrificación se realizó en pajuelas y no en tubos de vitrificación (Figura 7).

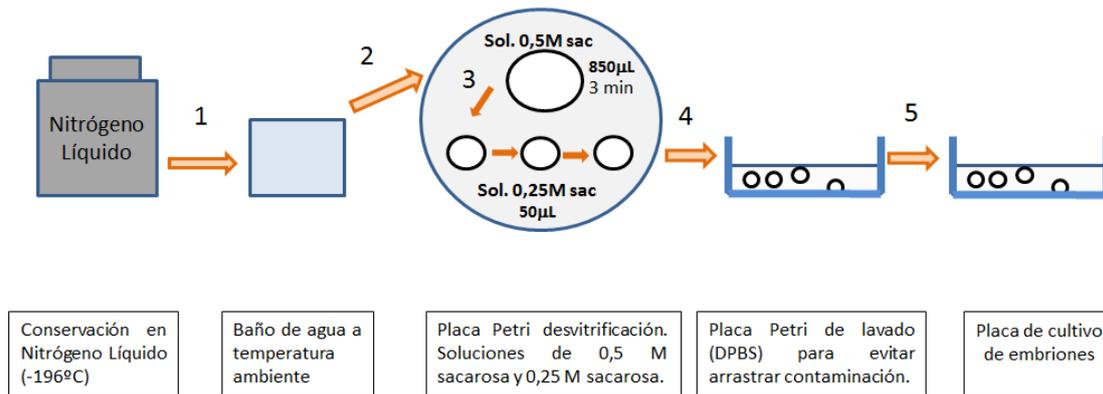


Figura 7. Esquema seguido para la desvitrificación de mórulas de conejo. El ascenso de temperatura para desvitrificar se produjo por inmersión de las pajuelas en un baño de agua a temperatura ambiente (1). Se colocaron los embriones en 850µL de solución de desvitrificación 0,5M de sacarosa (2). Pasados tres minutos, se pasaron los embriones por tres gotas de 50µL de solución de desvitrificación 0,25M de sacarosa (3). Se lavaron los embriones en DPBS (4) y se pusieron a cultivar (5).

Las pajuelas contenidas en nitrógeno líquido se sacaron, sumergieron y agitaron energéticamente en un baño de agua a temperatura ambiente (1). A continuación, se quitó el tapón de la pajuela y se cortó el extremo para dejar caer los embriones en una solución de 0,5M de sacarosa (850µL) en la que permanecieron 3 minutos (2). Trascurrido este tiempo, se hicieron tres lavados pasando a los embriones por tres gotas de 50µL de solución 0,25M de sacarosa (3). Finalmente y antes de colocarlos en el medio de cultivo (5) los embriones fueron lavados en Placas Petri con DPBS para eliminar posibles restos asociados a las soluciones de equilibrio, vitrificación y desvitrificación (0,5 y 0,25M de sacarosa) (4).

Los embriones desvitrificados fueron cultivados *in vitro* en un medio de cultivo TMC199 (Sigma-Aldrich, St. Louis Mo, USA) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (50µg/mL de estreptomina y penicilina), filtrado previamente con un filtro de Nylon con diámetro de poro de 0,22µm. Las condiciones de cultivo en el incubador fueron de 38,5°C, 5%CO<sub>2</sub> y humedad saturada. Tras 24 de cultivo se anotó el número de embriones que habían alcanzado el estadio de blastocisto.

### 3.6 TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

La valoración *in vivo* de los embriones vitrificados y mantenidos durante 15 días a -196°C se realizó por transferencia mediante laparoscopia de los embriones morfológicamente normales tras la desvitrificación a un total de 10 conejas receptoras (4 para transferencia de embriones no vitrificados control y 6 para transferencia de embriones vitrificados). Se transfirieron un total

de 128 embriones (49 control y 79 vitrificados) siendo 6-7 el número de embriones por oviductos (12-14 embriones por hembra receptora). Las conejas receptoras se sincronizaron induciendo su ovulación con 1µg de Acetato de Buserelina que fue administrado vía intramuscular 72 horas antes de la transferencia (Suprefact, Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid, España). Para la transferencia, las conejas fueron anestesiadas con 5mg/kg de Xylazine (Rompún; Bayer A.g., Leverkusen, Germany), tras 5 minutos se administró una dosis de 16mg/kg de Clorhidrato de Ketamina (Imalgène 500; Merial S.A., Lyon, France). El proceso de laparoscopia se llevó a cabo según el protocolo de Besenfelder and Brem (1993) tras el cual las conejas fueron tratadas con antibióticos (200 000 IU procaina penicilina y 250 mg de estreptomina Duphaphen Strep; Pfizer, S.L., Madrid, Spain).

#### 3.7 VALORACIÓN DE EMBRIONES IMPLANTADOS

La tasa de implantación fue valorada a los 11 días de la transferencia coincidiendo con el día 14 de desarrollo embrionario y una vez sorteada la primera fase de pérdidas embrionarias.

Para evaluar la tasa embriones implantados todas las hembras fueron sometidas a laparoscopia utilizando el mismo protocolo de anestesia y posterior administración de fármacos descrito en el apartado anterior.

#### 3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El porcentaje de embriones intactos post-vitrificación y, la viabilidad de los embriones control y vitrificados tanto *in vitro* (porcentaje de blastocistos) como *in vivo* (tasa de implantados como de nacidos) fueron analizados mediante una chi-cuadrado con corrección de Yates.

El peso al nacimiento fue analizado mediante un análisis de varianza que incluía como factor fijo el tipo de embrión (vitrificado o no) y la covariable número de nacidos.

Todos los análisis se realizaron con el software Statgraphics Centurion XVI.

## *4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

**4.1 Valoración de los embriones en cultivo hasta  
blastocisto**

**4.2 Valoración de los embriones *in vivo***

#### 4.1 VALORACIÓN DE LOS EMBRIONES EN CULTIVO *IN VITRO* HASTA BLASTOCISTO

Tras 24 horas de cultivo *in vitro* se anotó el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto para cada línea (A y V) y cada grupo (Control, Grupo 1 y Grupo 2). Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Supervivencia y desarrollo de embriones *in vitro* para los diferentes grupos establecidos.

Embriones	Línea	Nº mórulas	Recuperados* (%)	Blastocistos desarrollados** (%)
Control	A	46	-	46 (100) <sup>a</sup>
	V	39	-	39 (100) <sup>a</sup>
Grupo 1 (-196°C)	A	46	46 (100) <sup>a</sup>	44 (95,6) <sup>a</sup>
	V	65	59 (90,7) <sup>ab</sup>	28 (47,5) <sup>b</sup>
Grupo 2 (-80°C)	A	40	36 (90,0) <sup>ab</sup>	0 (0) <sup>c</sup>
	V	69	60 (86,9) <sup>b</sup>	0(0) <sup>c</sup>

\* Recuperados: número de embriones morfológicamente intactos tras la desvitrificación.

\*\* Blastocistos desarrollados a las 24 horas de cultivo.

Grupo 1: embriones vitrificados en medio HOVm y mantenidos durante 15 días a -196.

Grupo 2: embriones vitrificados en medio HOVm y mantenidos a -80°C durante 15 días y sumergidos en nitrógeno líquido previa desvitrificación.

Valores con diferente superíndice de las columnas son estadísticamente significativos P<0,05.

##### 4.1.1 Valoración De Grupos Y Líneas

La viabilidad *in vitro* de los embriones vitrificados resultó afectada por la línea de origen de los embriones y por la temperatura de almacenamiento. Así, los embriones vitrificados de la línea V y almacenados a -196°C mostraron un desarrollo a blastocisto inferior a la línea A (Tabla 7), siendo el desarrollo de los embriones vitrificados de la línea A similar al obtenido con los controles de ambas líneas (95,6% y 100%, Tabla 7). Por el contrario, ningún embrión tuvo capacidad de desarrollo tras el almacenamiento a -80°C, a diferencia de lo mostrado por Mochida *et al.* (2013) para embriones de dos células de ratón y características de almacenaje similares (Tabla 4 y Tabla 7). A pesar de utilizar el estadio embrionario más favorable para la vitrificación de embriones en esta especie, mórula, éstas no fueron capaces de soportar probablemente los cambios estructurales de la solución y, los daños fisiológicos acumulativos y asociados al almacenaje a temperaturas en las que no se alcanza un estado termodinámico estacionario (Figura 8). Un hecho a destacar del medio utilizado fue el rápido desarrollo observado en los embriones vitrificados y almacenados a -196°C, los cuales alcanzaban el estadio de blastocisto, mostrando signos evidentes de inicio de expansión (eclosionados), ya en las primeras 24 horas post-desvitrificación. En estudios previos, este estadio suele

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

alcanzarse tras 36-48 horas de cultivo ya que los embriones vitrificados de conejo, en general crioconservados, muestran un retraso en su desarrollo, lo que justifica que en las transferencias de estos embriones se realicen de forma asíncrona, en torno a 12 horas (Tsunoda *et al.*, 1982; Vicente y García-Ximénez, 1994, Mehaisen *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2006; Viudes-de-Castro *et al.*, 2010). El 95,6% obtenido para los embriones vitrificados de la línea A, se encuentra dentro del rango de los resultados publicados para un medio de composición similar 40% Etilenglicol + 18% Ficoll + 0,3M Sacarosa (100% y 48 horas de cultivo, Kasai *et al.*, 1992) o un medio con 35% dimetilsulfóxido y 5% dextrano (93% y 48 horas de cultivo, Viudes de Castro *et al.*, 2010), y superiores a los observados tras 48 horas con un medio 20% dimetilsulfóxido-20% etilenglicol (Vicente y García-Ximénez, 1994; Silvestre *et al.*, 2002; Mehaisen *et al.*, 2006).

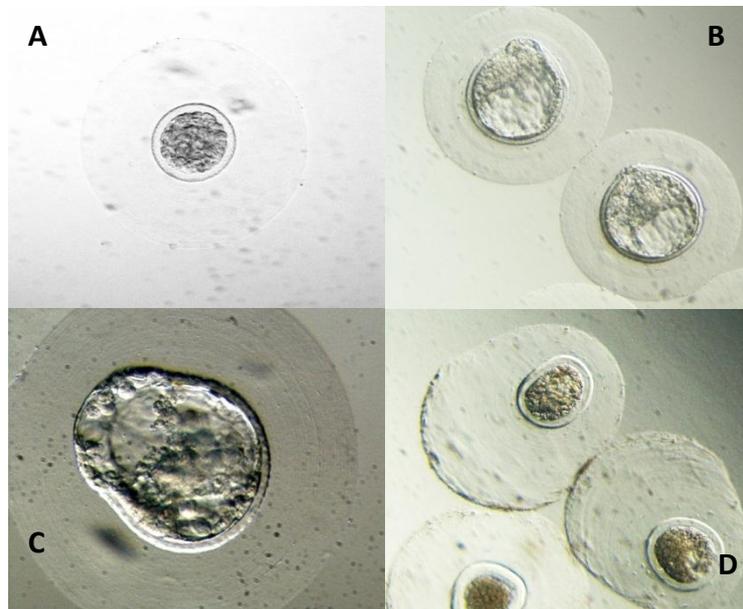


Figura 8. Cultivo de embriones. (A) Embrión en estadio de mórula, control. (B) y (C) Embriones, previamente vitrificados en medio HOVm y almacenados a  $-196^{\circ}\text{C}$  durante 15 días, en estadio de blastocisto tras la desvitrificación y 24 horas en cultivo correspondientes a las líneas V y A respectivamente. (D) Mórulas paradas de embriones vitrificados en medio HOVm y mantenidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 15 días y posterior inmersión en nitrógeno líquido previa desvitrificación.

En el caso de los embriones vitrificados de la línea A la tasa de desarrollo alcanzada y el estadio fue similar a los embriones control, lo que podría indicar que el medio de vitrificación empleado produce un menor daño sobre el embrión, permitiendo que alcance un mayor desarrollo durante un menor tiempo en cultivo *in vitro* y posibilitando realizar transferencias sincrónicas.

## 4.2 VALORACIÓN DE LOS EMBRIONES *IN VIVO*

Las transferencias embrionarias fueron valoradas tanto a nivel de embriones implantados como de gazapos nacidos, nacidos vivos y sus pesos (Tabla 8). Los resultados de las transferencias sincrónicas (72 horas de edad de los embriones-72 horas de pseudogestación en las conejas receptoras) confirman los resultados del cultivo *in vitro* para los embriones de la línea A. Reseñar que en una coneja gestante transferida con embriones vitrificados sólo se obtuvo un embrión implantado, que consecuentemente con las características de esta especie, la gestación no llegó a término ya que se requieren al menos 2 unidades feto-placentarias para finalizar la gestación.

Tanto el porcentaje de embriones implantados como el de nacidos fueron similares a los del grupo control (Tabla 8), encontrándose los valores de este estudio dentro del rango observado por otros autores, tanto para procedimientos y medios de vitrificación como de congelación para esta especie (Tsunoda *et al.*, 1982, Kasai *et al.*, 1992; Kauffman *et al.*, 1998; Vicente and García-Ximénez, 1994, Mehaisen *et al.*, 2006; Vajta and Kuwayama, 2006; Marco-Jiménez *et al.*, 2013; Vicente *et al.*, 2013). Los resultados de viabilidad *in vivo* más bajos en esta especie, del 5,6 al 26%, corresponden con estudios en los que se ha demostrado que el origen genético de los embriones y factores como la superovulación tenían una influencia negativa sobre la respuesta de los embriones a la vitrificación (Kauffman *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2006).

**Tabla 8. Tasas de implantación, nacimientos y pesos de los gazapos a partir de embriones control y, vitrificados en medio HOVm y almacenados durante 15 días.**

Procedimiento	Hembras receptoras	Embriones transferidos	Implantados *(%)	Nacidos** (%)	Peso (%)
Controles	4	49	32 (65,3)	31 (63,3)	60,7 ± 2,13
Vitrificados	6	79	48 (60,8)	41 (51,9)	62,2 ± 1,85

\*Porcentaje de Implantados y Nacidos calculados en base al número de Embriones transferidos.

\*\* El porcentaje de Nacidos y nacidos vivos fue el mismo.

Vitrificados: mórulas de conejo vitrificadas en medio HOVm y almacenadas durante 15 días a -196°C

Los datos mostrados fueron analizados mediante chi-cuadrado no encontrando diferencias significativas. El coeficiente de la covarianza “tamaño de camada” del peso sí que resultó significativo con un valor de -4,1 ± 0,73.

En cuanto al peso de los gazapos, no se obtuvieron diferencias significativas entre los dos grupos (controles y vitrificados), el coeficiente de la covarianza “tamaño de camada” sí resultó significativo con un valor de -4,2 ± 0,73. Se pudo observar por tanto como el tamaño de

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

camada influye en el peso de los gazapos nacidos, siendo el peso mayor cuanto menor es el número de gazapos nacidos.

## *5. CONCLUSIONES*

- ✓ El medio de vitrificación con un 42,5% (v/v) Etilenglicol, 18% (peso/v) Dextrano y 1,01 M Sacarosa permite obtener una elevada tasa de supervivencia *in vitro* e *in vivo* en embriones de la línea A, similar a los embriones cultivados y transferidos del grupo control.
- ✓ El medio ensayado no permite mantener de modo viable a los embriones de conejo en estadio de mórula a -80°C durante 15 días.

## *6. REFERENCIAS*

- 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.
- BAGIS H.; MERCAN H.O.; CETIN S.; SEKMEN S. (2005). The effect of equilibration time on survival and development rates of mouse pronuclear-stage embryos vitrified in solid surface (SSV) and conventional straws: *In vitro* and *in vivo* evaluations. *Molecular reproduction and development*, 72: 494-501.
- BARBAS J.P. and MASCARENHAS R.D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm *Cell. Cell and Tissue Banking*, 10: 49-62.
- BEEBE L.F.; CAMERON R.D.; BLACKSHAW A.W.; KEATES H.L. (2005). Changes to porcine blastocyst vitrification methods and improves litter size after transfer. *Theriogenology*, 64: 879-890.
- BESENFELDER U. and BREM G. (1993). Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *Journal Reproduction and Fertility*, 99: 55-6.
- CAMPBELL K.H.S.; FISHER P.; CHEN W.C.; CHOI I.; KELLY R.D.W.; LEE J.H.; XHU J. (2007). Somatic cell nuclear transfer: past, present and future perspectives. *Theriogenology* 68(Supplement 1), S214–S231.
- CHIAN R.-C. (2010). Cryobiology: an overview, en: *Fertility Cryopreservation*. 1st Edition. Cambridge. Cambridge (United Kingdom), 1-9.
- COBO A. and DIAZ C. (2011). Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and Sterility*, 96: 277–285.
- DAHLEN C.; LARSON J.; LAMB G.C. (2014). Impacts of reproductive technologies on beef production in the United States. *Advantages in Experimental Medicine and Biology*, 752: 97-114.
- DHALI A.; ANCHAMPARUTHY V.; BUTLER S.; PEARSON R.; MULLARKY I.; GWAZDAUSKAS F. (2007). Gene expression and development of mouse zygotes following droplet vitrification. *Theriogenology*, 68: 1292–1298.
- ESTANY J.; BASELGA M.; BLASCO A.; CAMACHO J. (1989). Mixed model methodology for the estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits. *Livestock Production*

*Science*, 21: 67-76.

FABBRI R.; VICENTI R.; MACCIOCA M.; PASQUINELLI G.; PARADISI R.; BATTAGLIA C.; MARTINO N.A.; VENTUROLI S. (2014). Good preservation of stromal cells and no apoptosis in human ovarian tissue after vitrification. *Biomed Research International*, ID 673537.

FOGARTY N.M.; MAXWELL W.M.C.; EPPLESTON J.; EVANS G. (2000). The viability of transferred sheep embryos after long-term cryopreservation. *Reproduction Fertility and Development*, 12: 31–7.

GAJDA B.; SMORAG Z. (2009). Oocyte and embryo cryopreservation—state of art and recent developments in domestic animals. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18: 371-387.

GLENISTER P.H.; THORNTON C.E. (2000).Cryoconservation-archiving for the future. *Mammalian Genome*, 11: 565–71.

GOOSSENS E.; VAN SAEN D.; TOURNAYE H. (2013). Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic. *Human Reproduction*, 28: 897-907.

GUNASHEELA D. and GUNASHEELA S. (2014). Strategies for fertility preservation in young patients with cancer: a comprehensive approach. *Indian Journal of Surgical Oncology*, 5: 17-29.

HENG B. (2007). Oocyte cryopreservation as alternative to embryo cryopreservation-some patient ethical concerns. *Reproductive Biomedicine Online*, 14: 402-403.

HOLT W.V. (2000a). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53: 47-58.

HOLT W.V. (2000b). Basic aspect of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Sciences*, 62:3-22.

KASAI M.; HAMAGUCHI Y.; ZHU S.E.; MIYAKE T.; SAKURAI T.; MACHIDA T. (1992). High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biology of Reproduction*, 46: 1042-1046.

KATKOV I.I.; KIM M.S.; BAJPAI R.; ALTMAN Y.S.; MERCOLA M.; LORING J.F.; TERSKIKH A.V.; SNYDER E.Y.; LEVINE F. (2006). Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology*, 53: 194–205.

KAUFFMAN R.D.; SCHMIDT P.M.; RALL W.F.; HOEG J.M. (1998). Superovulation of rabbits with FSH alters *in vivo* development of vitrified morulae. *Theriogenology*, 50: 1081-1092.

- KNIJM H. (2013). European statistical data of bovine embryo transfer activity 2012. *European embryo transfer association*, newsletter 40.
- KONC J.; KANYÓ K.; KRISTON R.; SOMOSKÖI, CSEH S. (2014). Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *BioMed Research International*, 2014: Article ID 307268.
- KUWAYAMA M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*, 67: 73-80.
- LEE Y.A.; KIM Y.H.; HA S.-J.; KIM K.J.; KIM B.-J.; KIM B.-G.; CHOI S.-H.; KIM I.-C.; SCHMIDT J.A.; RYU B.Y. (2014). Cryopreservation of porcine spermatogonial stem cells by slow-freezing testis tissue in trehalosa. *Journal of Animal Science*, 92: 984-995.
- LIEBERMANN J.; NAWROTH F.; ISACHENKO V.; ISACHENKO E.; RAHIMI G.; TUCKER M.J. (2002). Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of Reproduction*, 67: 1671–1680.
- MAPLETOFT R.J. and HASLER J.F. (2005). Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Revue Scientifique et Technique Office of Epizootics*, 24: 393-403.
- 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.; LAVARA R.; JIMÉNEZ-TRIGOS E.; VICENTE J.S. (2013). *In vivo* development of vitrified rabbit embryos: Effects of vitrification device, recipient genotype, and asynchrony. *Theriogenology*, 79: 1124-1129.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO S.; PÉREZ-CEREZALES S.; ROBLES V.; ANEL L.; HERRÁEZ M.P. (2008). Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryos by a non-invasive method. *Cryobiology*, 56, 216-222.
- MAZUR P.; LEIBO S.P.; SEIDEL G.E., Jr. (2008). Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and Future Directions. *Biology of Reproduction*, 78: 2-12.

- 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.
- MOCHIDA K.; HASEGAWA A.; LI M-W.; FRAY M.D.; KITO S.; VALLELUNGA J.M.; KENT LLOYD K.C.; 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.
- PAYNTER S.J and FULLER B.J. (2007). Cryopreservation of Mammalian Oocytes, en: *Methods in Molecular Biology Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Vol.368. 2<sup>nd</sup> Edition. Humana Press. Totowa (New Jersey), 313-324.
- PEGG D.E. (2007). Principles of Cryopreservation, en: *Methods in Molecular Biology Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Vol.368. 2<sup>nd</sup> Edition. Humana Press. Totowa (New Jersey), 39-57.
- PORCU E. and VENTUROLI S. (2006). Progress with oocyte cryopreservation. *Current Opinion Obstetrics and Gynecology*, 18: 273–279.
- QUINN P. (2010). Suppression of ice in aqueous solutions and its application to vitrification in assisted reproductive technology, en: *Fertility Cryopreservation*. 1<sup>st</sup> Edition. Cambridge. Cambridge (United Kingdom), 10-15.
- QUINTANS C.J.; DONALDSON M.; BERTOLINO M.V.; GODOY H.; PASQUALINI S. (2002). Birth of a healthy baby after transfer of embryos that were cryopreserved for 8.9 years. *Fertility Sterility*, 77: 1074 – 1076.
- RALL W. and FAHY G. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313: 573–575.
- SAENZ-DE-JUANO M.D.; MARCO-JIMENEZ F.; SCHAMALTZ-PANNEAU B.; JIMENEZ-TRIGOS E.; VIUDES-DE-CASTRO M.P.; PEÑARANDA D.S.; JOURNEAU L.; LECARDONNEL J.; LAVARA R.; NATURIL-ALFONSO C.; DURANTHON V.; VICENTE J.S. (2014). Vitrification alters rabbit foetal placenta at transcriptomic and proteomic level. *Reproduction*, 147: 789-801.

- SALVETTI P.; JOLY T.; RENARD J.P. (2007) Viability of rabbit embryos after 14 years storage in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 55: 364.
- SANCHEZ-OROSIO J.; CUELLO C., GIL M.A.; PARRILLA C.; ALMIÑANA I.; CABALLERO I.; ROCA J.; VAZQUEZ J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ H.; MARTINEZ E.A. (2010). *In vitro* postwarming viability of vitrified porcine embryos: Effects os cryostorage length. *Theriogenology*, 74: 486-490.
- SARAGUSTY J. and ARAV A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Society for Reproduction and fertility*, 141: 1-19.
- 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.
- SILVESTRE M.A.; SAEED A.M.; ESCRIBÁ M.J.; GARCÍA-XIMÉNEZ F. (2002). Vitrification of *in vitro* cultured rabbit morulae. *Animal Reproduction Science*, 76: 113-124.
- SUCCU S.; BEBBERE D.; BOGLIOLO L.; ARIU F.; FOIS S.; LEONI G.G.; BERLINGUER F.; NAITANA S.; LEDDA S. (2008). Vitrification of *in vitro* matured ovine oocytes affects *in vitro* pre-implantation development and mRNA abundance. *Molecular Reproductive and Development*, 75: 538–546.
- SWAIN J.E. and SMITH G.D. (2010). Cryoprotectants, en: *Fertility Cryopreservation*. 1<sup>st</sup> Edition. Cambridge. Cambridge (United Kingdom), 24-37.
- SZELL A.Z. and WINDSOR D.P. (1994). Survival of vitrified sheep embryos *in vitro* and *in vivo*. *Theriogenology*, 42: 881-119.
- THIBIER M. and WAGNER H.G. (2002). World statistics for artificial insemination in cattle. *Livestock Prod Science*, 72: 203-212.
- TSUNODA Y.; SOMA T.; SUGIE T. (1982). Effect of post-ovulatory age of recipient on survival of frozen-thawed rabbit morulae. *Journal of Reproduction Fertility*, 65: 483-487.
- VAJTA G. and KUWAYAMA M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65: 236-244.
- VICENTE J.S. and GARCÍA-XIMÉNEZ F. (1994). Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glicol on rabbit morulae. *Theriogenology*, 42: 1205-1215.
- VICENTE J.S.; LAVARA R.; BASELGA M. (2011) Does storage time in LN2 influence survival and pregnancy outcome of vitrified rabbit embryos? *Theriogenology*, 76:652-657.

- 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- JIMENEZ F. (2013). Rabbit morula vitrification reduces early foetal growth and increases losses throughout gestation. *Cryobiology*, 67: 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: 1623-1628.
- WITTHINGHAM D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 233: 126-126.
- WOELDERS H.; WINDING J.; HIEMSTRA S.J. (2012). How Developments in Cryobiology, Reproductive Technologies and Conservation Genomics Could Shape Gene Banking Strategies for (Farm) Animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 47:264-273.