



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES DE *Mus musculus* DE LA CEPA CD-1 CON DIFERENTES
CRIOPROTECTORES Y MÉTODOS DE
ALMACENAMIENTO”**

T E S I S

**Que para obtener el título de:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

Presenta:

EVELYN BIANEY HERNÁNDEZ MORALES

DIRECTORA:

DRA. ROSALINA MARIA DE LOURDES REYES LUNA

CODIRECTORA:

M. EN C. MONTSERRAT VÁZQUEZ BALBUENA

MAYO 2025



Agradecimientos.

A la Dra. Rosalina Reyes, por brindarme su conocimiento y apoyo en estos años de formación académica, que hicieron posible la consolidación de esta tesis. Además de la enseñanza de vida y la oportunidad que me ofreció en el mundo laboral, que constituyen un pilar importante para mí desarrollo profesional y como persona.

A la M. en C. Montserrat, por su acompañamiento, enseñanza y guía en los procesos administrativos para culminar este proyecto; además de su tiempo y consejos de vida.

A la Bióloga Zaira Caselín que siempre me apoyo en la parte técnica de los experimentos realizados en el laboratorio, y que sacó a flote el mantenimiento de mis embriones congelados en tiempos de pandemia (de no haber sido por ella, hoy no estaría presentando la tesis) y en la parte del crecimiento personal estar ahí cuando lo he necesitado.

A Guadalupe (Luliz), quién me enseñó que la paciencia al enseñar es fundamental para un buen trabajo en equipo de laboratorio, además de la motivación con consejos de la vida y en el laboratorio.

A Everardo y Gibran, por su amistad y su disposición a siempre a ayudar.

A los chicos del laboratorio de Biología de la reproducción (Alain, Analy, Alma, Edwin, Lupita) que compartieron información sobre nuestros proyectos y aportaron su granito de arena en el acervo de la ciencia, junto a buenos momentos divertidos durante la estancia.

A mis amigos más cercanos Vanesa por su complicidad y apoyo a través de los años. A Fernanda, Cirley y Cecy por su amistad en conjunto con las palabras de aliento y el buen humor. A Martha, Elsa, Emily, Diana, Martha Patricia, y Anita Medina, mis amigos de la vida y cursos de inglés quiénes a pesar de lo poco que me conocían, no dudaron siempre en recordarme que hay que seguir adelante pase lo que pase.

A mi familia por su amor, motivación constante en todos los aspectos de la vida, hoy al ver concluida esta tesis es una forma para agradecer lo que han hecho por mí.

ÍNDICE GENERAL

1. RESÚMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. FUNDAMENTOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN CELULAR	4
2.2. CRIOPROTECTORES	6
2.3.1 CRIOPROTECTORES PERMEABLES.....	6
DMSO.....	6
ETILENGLICOL.....	7
2.3.2 CRIOPROTECTORES IMPERMEABLES.....	8
SACAROSA.....	8
GLUCOSA.....	9
2.3. MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN	10
2.3.1 CONGELACIÓN LENTA.....	11
2.3.2 VITRIFICACIÓN.....	12
VITRIFICACIÓN RÁPIDA.....	13
VITRIFICACIÓN ULTRARRÁPIDA.....	13
2.4. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES.....	14
2.5. HERRAMIENTAS DE ALMACENAJE PARA LA CRIOPRESERVACIÓN	15
2.5.1 CRIOVIAL	15
2.5.2 CRYOTOP	15
3. ANTECEDENTES	16
3.1. ESTADIO DE DESARROLLO PARA LA VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES..	16
3.2. EFECTOS CITOTÓXICOS.....	17
3.3. USO DE MODELOS MURINOS.....	17
3.4. HUMANOS.....	20
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
5. JUSTIFICACIÓN.....	21
6. HIPÓTESIS.....	22
7. OBJETIVOS.....	22
7.1. OBJETIVO GENERAL.....	22
7.2. OBJETIVOS PARTICULARES	22
8. METODOLOGÍA.....	23
8.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	23

8.2. INDUCCIÓN DE SUPEROVULACIÓN.....	24
8.3. OBTENCIÓN DE OVOCITOS	24
8.4. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOOIDES.....	25
8.5. FERTILIZACIÓN <i>in vitro</i> (FIV)	26
8.6. PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN Y ALMACENAMIENTO	27
8.7. VITRIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES	29
8.8. VITRIFICACIÓN CON EL MÉTODO DE CRYOTOP.....	30
8.9. DESVITRIFICACIÓN.....	31
8.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
9. RESULTADOS.....	33
EMBRIONES RECUPERADOS DE LA DESVITRIFICACIÓN	34
1) USANDO CRIOVIALES.....	34
2) USANDO CRYOTOP.....	36
EFECTO DE LA MEZCLA DE CRIOPROTECTORES.....	37
EFECTO DEL MÉTODO DE ALMACENAJE.....	37
10. DISCUSIÓN.....	38
11. CONCLUSIÓN.....	41
12. BIBLIOGRAFÍA.....	42

1. RESÚMEN

La criopreservación hoy en día es una herramienta importante para los bancos biológicos dedicados a la reproducción asistida. Cada vez más se realizan más esfuerzos en la búsqueda para encontrar protocolos con diferentes técnicas y crioprotectores que aumenten la recuperación de óvulos y espermatozoides viables después de la criopreservación y, en especial, de embriones que después de su transferencia concluyan con altas tasas de embarazos y nacimientos vivos. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: 1) determinar si la combinación de crioprotectores permeables y no permeables conservan la viabilidad de embriones de *Mus musculus* de la cepa CD-1 y 2) analizar si el uso de diferentes dispositivos para el almacenaje mejora la recuperación de embriones viables criopreservados por vitrificación ultrarrápida en nitrógeno líquido (-196°C). En este estudio se realizaron 10 experimentos en los que se obtuvieron embriones de ratones de la cepa CD-1 por medio de fertilización *in vitro*. Después de la fecundación, los embriones se incubaron y desarrollaron hasta la etapa D2 (24±1 horas de desarrollo), momento en el que se criopreservaron. Los crioprotectores usados fueron a) DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25 M o b) etilenglicol 4.5 M + glucosa 0.25 M y los dispositivos utilizados fueron crioviales (Corning Incorporated CORNING®) o criotop (Cryotech®). Los embriones de ratón criopreservados en DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25 M y almacenados a -196 °C en cualquiera de las dos herramientas (criovial o cryotop) presentaron un mejor porcentaje de supervivencia embrionaria en comparación con el uso de las otras combinaciones de crioprotectores manejadas en este trabajo. Se requiere seguir investigando sobre estas técnicas para alcanzar tasas más altas de supervivencia celular, el desarrollo del embrión hasta la etapa de blastocisto y su implantación, que den como resultado la preñez y el nacimiento de ratones sanos y, posteriormente, extrapolar el mejoramiento de estas técnicas a las clínicas de reproducción asistida humana.

Palabras clave: Criopreservación, ratón, vitrificación, embriones, criovial, cryotop, supervivencia.

2. INTRODUCCIÓN

La criobiología es una rama de la biología cuyo objetivo principal es conservar células vivas a muy baja temperatura para lograr detener los procesos de envejecimiento y degeneración celular (Cabrera & Fernández, 2006). A partir de ésta técnica se deriva la criopreservación celular (Ávila et al., 2006), la cual tiene como objetivo mantener la viabilidad, la funcionalidad celular y minimizar los daños celulares que se pueden producir durante la congelación y descongelación celular, como son los daños estructurales y de funcionamiento de la membrana plasmática, el desplazamiento de las proteínas y los organelos citoplasmáticos, además de las alteraciones de la estructura y metabolismo celular (Cobo, 2008). La criopreservación celular es usada en diferentes áreas, como la medicina, veterinaria y biología.

En este campo, el uso y mejoramiento de las diferentes técnicas de congelación de embriones han aportado diferentes ventajas, por ejemplo, disminuye el riesgo de embarazos múltiples en humanos, ya que se puede usar uno de los embriones obtenidos en una fertilización *in vitro* y criopreservar el resto, aumentando la tasa de embarazo por ciclo, permite evitar la transferencia de embriones en ciclos con mala respuesta endometrial (sangrado, pólipos) y disminuye costos (Guzmán et al., 2008); otra ventaja de esta técnica es la postergación de la paternidad y/o maternidad debido a la edad de la pareja, por algún diagnóstico médico desfavorable o un tipo de tratamiento invasivo y tiempo disponible, entre otros.

Respecto a otras especies de animales, las ventajas de la criopreservación son de interés económico, como ocurre en especies de consumo o de investigación (animales de laboratorio) en donde se posibilita la transferencia de algunos embriones y la conservación de germoplasma (semillas, espermatozoides, óvulos, células germinales, tejidos embrionarios, cepas de bacterias, levaduras, hongos) (Cabrera & Fernández, 2006). En todos los casos, los embriones congelados pueden ser transportados de un lugar a otro, facilitando el traslado a nivel nacional e internacional, ya que es factible importar y exportar material genético valioso, a

bajo costo y con un mínimo riesgo de transmisión de enfermedades; además, es importante señalar que la congelación de embriones también puede ser utilizada en los pequeños núcleos de animales domésticos autóctonos, que son los más vulnerables al riesgo de extinción y por tanto a la pérdida de la diversidad genética. La congelación de gametos y embriones de estos animales, ofrecen la potencialidad de preservar el genoma animal mediante la creación de bancos de recursos genéticos para conservarlo por largos períodos de tiempo y que posteriormente serán descongelados para su utilización (Cabrera & Fernández, 2006).

Con respecto al tiempo de almacenamiento en el que las células pueden permanecer en latencia, algunos investigadores han propuesto la posibilidad de mantenerlas a -196°C durante 1000 años o más (Cabrera & Fernández, 2006); es decir, que el tiempo de congelación no produce cambios significativos celulares con un adecuado protocolo de criopreservación. Se ha demostrado que esto es posible porque existe una relación directa entre la temperatura de almacenamiento y el tiempo durante el que la muestra sigue siendo viable tras su criopreservación (Rivero & Risco, 2012). Esta evidencia la mencionó Svante August Arrhenius quien, desde 1898, desarrolló la ecuación que establece la influencia del descenso de la temperatura en la evolución de las reacciones químicas, por lo que a temperaturas inferiores de -140°C la actividad metabólica se detiene (Rivero & Risco, 2012). , Reforzando lo anterior; en 1949, Polge, Smith y Parkes descubrieron los efectos de los crioprotectores como el glicerol sobre espermatozoides y otras células de varias especies (Polge, 1952). Con esto, se desencadenaron una serie de descubrimientos subsecuentes que formaron las bases de la criobiología. En 1973, se logró el nacimiento del primer becerro procedente de un blastocito previamente criopreservado durante seis días en nitrógeno líquido (Cabrera & Fernández, 2006). Pero fue hasta 1983, que se consiguió el primer embarazo a partir de transferencia de embriones descongelados en humanos (Lazcano et al., 2010) y en 1986, Chen reportó el primer embarazo originado a partir de un ovocito humano criopreservado.

En la actualidad la criopreservación de embriones es una técnica transcendental empleada en los Tratamientos de Reproducción Asistida (TRA), que hacen uso de bancos biológicos, ubicados en Clínicas y Hospitales de Reproducción

Asistida (HRA), en los que se conservan tejidos, ovocitos, espermatozoides y embriones. Para el área de la Biología de la conservación, la criopreservación representa un avance de vital importancia puesto que la preservación a largo plazo de gametos y embriones de diversas especies, que se encuentran en categoría de riesgo o en peligro de extinción, representa el intento de mantener el equilibrio ecológico, puesto que este material biológico puede ser congelado por largos períodos de tiempo y posteriormente descongelarse para su utilización en la reducción de la pérdida de la biodiversidad, por lo que es un método relevante para la investigación que involucra los tiempos y condiciones de la vida suspendida, pues a esa temperatura la actividad biológica se detiene así como las reacciones bioquímicas que puedan producir la muerte celular (Ávila et al., 2006).

2.1. FUNDAMENTOS DE LA CRIOPRESERVACIÓN CELULAR

La membrana plasmática define los límites que contienen a los organelos dentro de la célula y los separa del medio externo (Alberts et al., 2010). La estructura general de la membrana plasmática consta de moléculas lipídicas y proteínas que se encuentran unidas por interacciones no covalentes dispuestas en una bicapa lipídica, formando una estructura asimétrica e impermeable a la mayoría de las moléculas hidrosolubles (Arrazola, 1994); además, estas estructuras son dinámicas y fluidas por lo cual, la mayoría de sus moléculas lipídicas y proteínas pueden desplazarse con rapidez por el plano de la membrana. (Arrazola, 1994). Las células mantienen una composición de lípidos en sus membranas que asegura un estado fluido de éstas con relación a las temperaturas a las que habitualmente están expuestas (Arrazola, 1994); por ejemplo, al ser sometidas a bajas temperaturas aumenta la rigidez de la membrana.

Para algunos investigadores, se podría pensar que las bajas temperaturas a las que se almacena el material biológico provocarían daños, sin embargo, lo discutible son los cambios de temperatura de enfriamiento y calentamiento. Los cambios osmóticos suceden en décimas de segundo, lo que provoca que sea muy difícil que el movimiento de moléculas a través de la membrana sea mediante

transporte activo durante los procesos de congelación y descongelación. Los daños intracelulares por enfriamiento ocurren a temperaturas entre los 20°C y -5°C y por lo regular se ven afectadas las gotas lipídicas, las membranas lipídicas y los microtúbulos (Vajta et al., 2007). Por otro lado, también están los daños ocasionados por la formación de cristales de hielo, el daño se produce por acción mecánica que actúa a lo largo de la formación y crecimiento del cristal (Vajta et al., 2007), lo que causa la destrucción de todos los organelos y membranas celulares; por ejemplo, los ovocitos y embriones en sus diferentes estados de desarrollo contienen cantidades diferentes de lípidos, lo que explica su sensibilidad diferente a lesiones causadas por el frío (Vajta et al., 2007). También existe el daño por criofractura o fracturas mecánicas que pueden suceder cuando alcanzan temperaturas entre los -50°C y los -150°C y que afecta principalmente la zona pelúcida en los ovocitos y embriones (Cobo, 2008).

Por lo tanto, evitar la formación de cristales dentro y fuera de la célula para mantener viables a las células que se someterán a congelación es un aspecto crucial para estas técnicas, por lo que es importante garantizar que tengan un entorno en el que la viscosidad del agua sea elevada dentro y fuera de la célula, para detener las reacciones químicas y la difusión de moléculas (Liebermann, 2008), por lo que para lograrlo es necesario utilizar crioprotectores.

Los agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles que modifican las propiedades fisicoquímicas de las soluciones líquidas presentes en los seres vivos. No obstante, sus funciones principales son promover una rápida deshidratación celular y amortiguar el efecto de la alta concentración de solutos en el interior de la célula (Rivero & Risco, 2012). Sin embargo, las concentraciones de los crioprotectores lamentablemente son tóxicas para las células a temperatura ambiente, por lo cual se deben respetar los tiempos de exposición de las células por arriba de los 4°C (Rivero & Risco, 2012).

Los crioprotectores se clasifican en permeables o impermeables, de acuerdo con el grado de penetración y de protección a las células sobre la formación de cristales de agua, su toxicidad química y la velocidad para penetrar en los tejidos (Rivero & Risco, 2012).

Otro aspecto importante a considerar de los crioprotectores es que son tóxicos y su efecto suele ser proporcional a su concentración y al tiempo de exposición, ya que el daño puede suceder con la disminución de la velocidad del cambio de temperatura al momento de la vitrificación y al momento de la descongelación, lo que evita la formación de cristales dentro y fuera del medio de las células (Vajta et al., 2007). Como consecuencia de la toxicidad y al daño osmótico, los orgánulos intracelulares pueden dañarse durante la criopreservación sufriendo el mayor impacto el núcleo, la envoltura nuclear, los microtúbulos de los husos meióticos, las mitocondrias y la zona pelúcida, (Smith & Villa, 2007), lo que puede comprometer el desarrollo de los embriones. Además, en el caso de la interrupción de la red microtubular eso podría conducir en última instancia a aneuploidía, si la repolarización no se produce adecuadamente después del descongelamiento (Smith & Villa, 2007). Se ha demostrado que crioprotectores como el DMSO y el 1-2 propanediol son capaces de disolver la actina cortical polimerizada (Smith & Villa, 2007), lo cual podría reducir este efecto negativo.

2.2. CRIOPROTECTORES

2.3.1 CRIOPROTECTORES PERMEABLES

Como ya se mencionó, los crioprotectores permeables son sustancias de bajo peso molecular que atraviesan la membrana celular, deshidratando a la célula por sustitución del agua intracelular y amortiguan el incremento de concentración de solutos en el medio extracelular (Rivero & Risco, 2012), impidiendo la formación de cristales en el interior y evitando el estrés osmótico. Algunos ejemplos de crioprotectores permeables son el 1-2 propanodiol, el dimetilsulfóxido (DMSO), el etilenglicol y el glicerol.

DMSO

El dimetilsulfóxido, mejor conocido como DMSO (figura 2), es un disolvente aprótico (que no puede donar ni recibir protones), polar, que es fácilmente miscible con medios acuosos y orgánicos debido a su naturaleza anfipática (Kang et al.,

2017), Además es capaz de disolver numerosos compuestos débilmente polares y apolares, por lo tanto, se considera un disolvente eficaz de compuestos insolubles en agua y en medios biológicos (Kang et al., 2017). También es comúnmente utilizado para el cultivo de células debido a sus propiedades de penetración de membrana y desplazamiento de agua (Kang et al., 2017), gracias a su bajo peso molecular de 78.13 g/mol, lo que le permite atravesar la membrana celular de forma rápida (Ávila et al., 2006), evitando la formación de hielo intracelular durante el proceso de congelación.

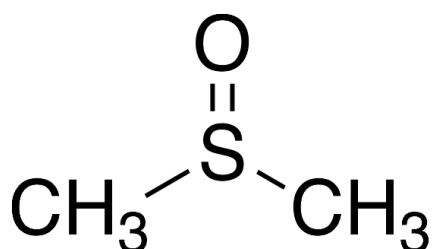


Figura 2. Fórmula química del DMSO. Imagen tomada de: <https://uniquim.iquimica.unam.mx/glossary/dimetil-sulfoxido/>

ETILENGLICOL

El etilenglicol (figura 3) es una sustancia líquida, sintética, que absorbe agua. No tiene olor, pero tiene un sabor dulce (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2010). Su fórmula empírica es CH_3O y la fórmula molecular $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ (Parry, 1974). Este compuesto se encuentra en productos como anticongelantes, líquidos de frenos hidráulicos, en la tinta de almohadillas de sellos, impresoras bolígrafos, también presente en soluciones congelantes.

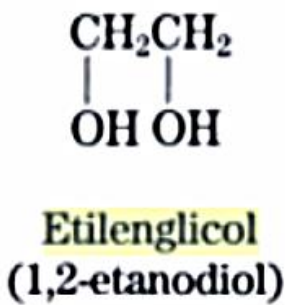


Figura 3. Representación del etilenglicol. Tomada de Bailey (2001).

La exposición a grandes cantidades de etilenglicol puede dañar los riñones, el sistema nervioso, los pulmones y el corazón. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2010).

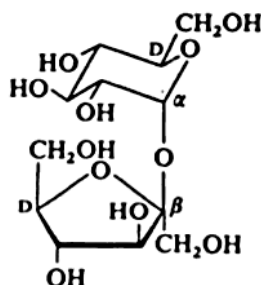
Tiene un peso molecular bajo (62.07 gr/mol) con respecto a otros crioprotectores como el glicerol (92.1), el DMSO (78.13) y el propilenglicol (76.1), lo que permite su rápida entrada y salida durante el procedimiento de congelación y descongelación de la célula (Bautista & Kanagawa, 1998). En el proceso de la congelación, protege a las células del daño ocasionado por la formación de cristales de hielo. Diversos estudios aseguran que el etilenglicol es eficaz cuando se usa como único crioprotector permeable o en combinación con macromoléculas, azúcares y otros crioprotectores (Bautista & Kanagawa, 1998).

2.3.2 CRIOPROTECTORES IMPERMEABLES

Los crioprotectores impermeables son sustancias de alto peso molecular que son efectivas al someter a las células a velocidades altas de congelación y son caracterizadas por ejercer su acción protectora promoviendo la rápida deshidratación celular, por lo que suelen ser utilizados asociados a los agentes penetrantes (Rivero & Risco, 2012). Entre los crioprotectores no penetrantes tenemos a la dextrosa, la glucosa, la sacarosa, la polivinilpirrolidona, el dextrano y el polietilenglicol.

SACAROSA

La sacarosa (azúcar de mesa) se obtiene de la caña de azúcar (figura 4), es un disacárido que por hidrólisis ácida genera una mezcla equimolecular de los dos monosacáridos que la componen: la D-glucosa y la D-fructosa (Allinger et al., 1984). Es una sustancia soluble en el agua que cristaliza en forma monoclinica característica, el punto de fusión de los cristales es aproximadamente 184 °C, es fácilmente soluble en agua y amoníaco, prácticamente insoluble en el alcohol etílico anhidro, en éter, en cloroformo y en glicerol anhidro (Allinger et al., 1984).



Sacarosa: α -D-glucopiranosil β -D-fructofuranósido
 β -D-fructofuranosil α -D-glucopiranosido

Figura 4. Estructura determinada por degradación y rayos X de la sacarosa. Tomado Allinger et al. (1984).

En criobiología, la sacarosa se ha empleado como un crioprotector que es menos dañino para las células, favorece la excreción de agua de la célula y disminuye la formación de cristales de hielo intracelular (Ramónez et al., 2017), en concentraciones hipertónicas se utiliza como crioprotector de embriones (Ali & Shelton, 1993).

GLUCOSA

La glucosa es un monosacárido cuya fórmula química condensada es $C_6H_{12}O_6$ y su estructura recibe la designación química de D-Glucopiranososa, en donde el oxígeno forma parte del anillo (Figura 5) (Jérez, 2008). Es menos soluble en agua que la sacarosa; las soluciones saturadas contienen 49.4% a 23°C y 54.6% a 30°C, de azúcar anhidro (Jérez, 2008). Como crioprotector, la glucosa protege a la célula cuando es sometida a bajas temperaturas previniendo el daño celular, ya que la deshidrata minimizando la formación intracelular de cristales de agua (Córdova et al., 2015).

Estructura Química

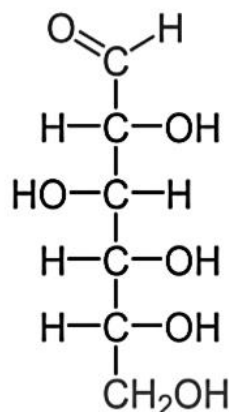


Figura 5. Estructura química de la glucosa Tomado de <http://www.redciteg.org.mx/documentos/tripticos/idioma/Glucosa.pdf>

Un ejemplo interesante de su uso en la naturaleza es que se ha descrito en varios estudios que la glucosa actúa como agente crioprotector dentro del organismo de al menos seis especies de anfibios anuros: *Rana sylvatica*, *Lithobates catesbeianus*, *Pseudacris triseriata*, *Acris crepitans*, *Pseudacris crucifer* y *Rhinella schneider* (Hernández, 2016) cuándo estos organismos se encuentran en condiciones de frío extremo.

2.3. MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Actualmente existen dos métodos para la criopreservación de embriones, que son la congelación y la vitrificación. Estos métodos tienen como fundamento el deshidratar la célula con el uso de un crioprotector, para prevenir la formación de cristales de hielo intracelular y minimizar el daño que éstos causan (Cabrera & Fernández, 2006). Cabe mencionar que el primer logro de la criopreservación de embriones realizado en humanos fue en 1972, por medio de congelación lenta, de aquí en adelante se han mejorado las técnicas de criopreservación (Cabrera & Fernández, 2006).

2.3.1 CONGELACIÓN LENTA

La congelación lenta es un protocolo pionero de la criopreservación que consiste en la utilización de bajas concentraciones de crioprotectores y una tasa lenta de enfriamiento (Rosemberg, 2009). Este método usualmente se realiza usando biocongeladores programables para realizar el descenso lento de temperatura, incluyendo estrategias de enfriamiento como es la inyección de vapor de nitrógeno, el movimiento de la muestra a través de un gradiente frío en refrigeradores programados o el mantenimiento de las muestras sumergidas en nitrógeno líquido (Hurtado et al., 2008).

En la congelación todos los protocolos son diseñados para bajar la temperatura de criopreservación lentamente, la velocidad de enfriamiento, en el caso del método tradicional de congelación, va de 0.3° a 0.6 °C por minuto, a partir de temperaturas de -4.5° a los -35°C, en donde previamente se han expuesto las células a un crioprotector para remover el agua intracelular y evitar la formación de cristales de hielo (Vajta & Yovich, 2008).

Durante este método, los óvulos y embriones pasan por varias etapas previas al estado de criopreservación. La primera consiste en superar el shock frío, dónde se experimentan fluctuaciones de temperatura sobre su punto de congelación, superándose con el descenso de temperatura de manera uniforme y lenta. Algo que distingue a la congelación lenta es que cuando los embriones sumergidos en solución crioprotectora llegan a una temperatura inferior al punto de congelación del crioprotector, éste último no se cristaliza y mantiene su estado líquido, en este punto se controla la formación de cristales extracelulares al generar un ambiente hipertónico que permite que el embrión se deshidrate por exosmosis (Hurtado et al., 2008). Es importante que la velocidad de enfriamiento no sea muy lenta ya que podría generar una deshidratación excesiva del embrión, llevándolo a un colapso celular irreversible. La última y siguiente etapa del enfriamiento lento es llamado "*break point*", que se alcanza entre los -30°C y -80°C. Una vez que se alcanza esta temperatura, se realiza un descenso rápido, hasta llegar a la temperatura de almacenamiento, que por lo regular son -196°C en tanques de nitrógeno.

2.3.2 VITRIFICACIÓN

La vitrificación es una técnica de congelación que se refiere al uso de una solución que se convierte en un sólido vítreo amorfo (Liebermann, 2008) por la elevación extrema de la viscosidad (Kuwayama et al., 2014), libre de cristales de hielo y que se logra al utilizar crioprotectores altamente concentrados (Sakai & Engelmann, 2007; Cabrera & Fernández, 2006) o por la mezcla de más crioprotectores o la eliminación o adición rápida de calor (Liebermann, 2008).

Se considera que la vitrificación es una técnica económica, sencilla y la más rápida, ya que no requiere el uso de congeladores programables sólo es cuestión de que las células a congelar se sometan a una solución crioprotectora, se coloquen en una herramienta de almacenaje y se sumerjan en nitrógeno líquido; además las células se enfrían a bajas temperaturas de manera extremadamente rápida, a una velocidad de alrededor de los 15 000-30 000°C/min (Liebermann et al., 2002). Es decir, que la célula se congela en contacto al nitrógeno líquido en un segundo, lo que es equivalente a un descenso de temperatura de entre 250° C y 500°C por segundo.

Se conocen dos métodos de vitrificación, la vitrificación rápida y la vitrificación ultra rápida (Figura 1).

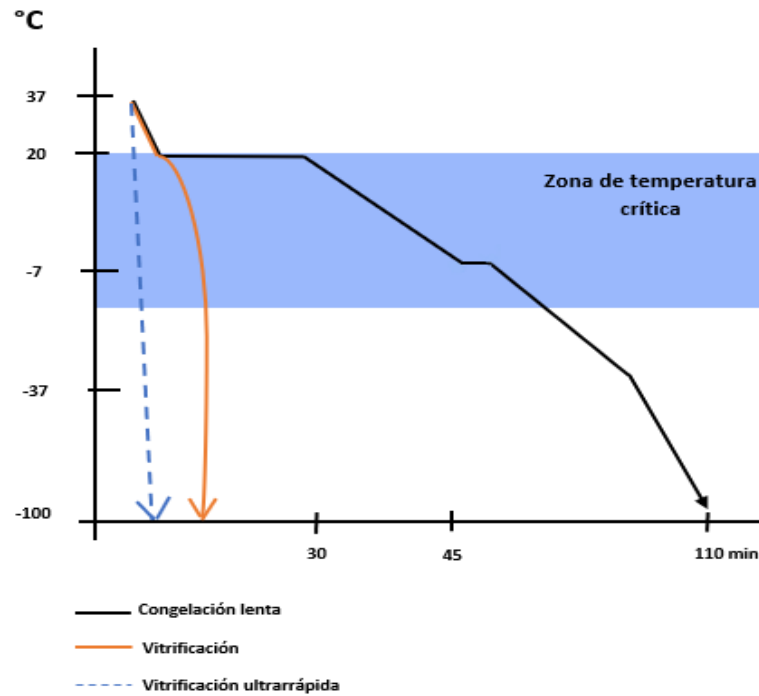


Figura 1. Curva de velocidades de enfriamiento de ovocitos y embriones, durante la congelación lenta, la vitricificación usando pajuelas como almacenamiento y la vitricificación ultrarrápida (contacto directo con nitrógeno líquido a -196°C) de acuerdo con diferentes metodologías (Vajta & Yovich, 2008).

VITRIFICACIÓN RÁPIDA

La vitricificación rápida consiste en la deshidratación celular utilizando altas concentraciones de crioprotector (Ávila et al., 2006), mediante el empleo de vapores de nitrógeno que congelan la muestra para después introducirla en el nitrógeno líquido, llevando la muestra de una temperatura de -80°C a -196°C . Actualmente, la vitricificación de blastocistos es aceptada por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva y por la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología como un tratamiento médico seguro y eficaz (Zegers et al., 2014).

VITRIFICACIÓN ULTRARRÁPIDA

La vitrificación ultrarrápida evita la formación de hielo al permitir el paso de una fase líquida a una sólida en fracción de segundos, con ello se mejora la estabilidad y el mantenimiento del esqueleto celular (Zegers et al., 2014) con el uso de una mezcla de crioprotectores en concentraciones altas, que a bajas temperaturas aumentan la viscosidad formando un sólido amorfo (Ávila et al., 2006). Al igual que la vitrificación rápida, no es necesario el uso de congeladores programables ya que los embriones inmediatamente se ponen en contacto con el nitrógeno líquido.

El método de vitrificación ultrarrápida ha sido utilizado exitosamente para congelar óvulos y embriones de animales de laboratorio (Palma, 2001), una vez terminado el tratamiento con el crioprotector se vitrifican los embriones introduciéndolos directamente al nitrógeno líquido en donde son almacenados. Estos avances lograron tasas de supervivencia embrionaria entre 90% y 97% (Zegers et al., 2014), al momento de descongelar, cuando los embriones se criopreservan en estadio de blastocistos, es decir, al quinto día del desarrollo embrionario *in vitro*. La viabilidad de las células dependerá de la temperatura del nitrógeno líquido y del crioprotector utilizado (Vara & Gil, 2011). Para evaluar la viabilidad celular, lo más recomendable es determinarla a las 48 horas después de la vitrificación.

Actualmente, la vitrificación de blastocistos es aceptada por la Sociedad Americana de Medicina Reproductiva y la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología como un tratamiento médico seguro y eficaz (Zegers et al., 2014).

2.4. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES

La criopreservación de embriones en mamíferos se inició en 1972, con base en los estudios experimentales de Wilmut y Whittingham (Álvarez, 2007), quienes mostraron que los embriones de ratón en etapas tempranas de desarrollo que se congelaron en presencia de DMSO obtuvieron una buena supervivencia embrionaria con llegada a término obteniendo ratones vivos (Álvarez, 2007). En 1973, se logró el nacimiento del primer becerro procedente de un blastocisto previamente criopreservado durante seis días en nitrógeno líquido, al utilizar una

solución 2 M de DMSO y empleando una velocidad de congelación de 0.2°C/min y descongelación de 360 °C/min (Cabrera & Fernández, 2006).

Actualmente en el área de la reproducción asistida se emplea como herramienta la criopreservación de óvulos, espermatozoides y embriones para posteriormente hacer uso de ellos.

2.5. HERRAMIENTAS DE ALMACENAJE PARA LA CRIOPRESERVACIÓN

Para que la vitrificación resulte óptima, es de gran importancia considerar que la herramienta de almacenaje a utilizar se enfríe a una velocidad similar a la velocidad de enfriamiento del método utilizado, es decir, se debe enfriar lo más rápido posible y alcanzar la temperatura en la que la muestras serán almacenadas, cuidando que no exista una contaminación cruzada de los embriones. Por lo tanto, se han creado diversas herramientas que, en su mayoría, pretenden conseguir una transferencia de calor óptima (Rivero & Risco, 2012). Entre las herramientas de almacenaje que existen, encontramos al cryotop, cryostage, capilares de policarbonato, crioloops, closed pulled straws, open pulled straws, rejilla de cobre de microscopía electrónica, ampollas de vidrio, pajuelas, entre otros (Hurtado et al., 2008; Rivero & Risco, 2012).

2.5.1 CRIOVIAL

Los crioviales de plástico son herramientas accesibles y económicas, de fácil manejo y transporte, puesto que pueden contener muchos embriones y dan resultados favorables para la criopreservación. Son elaborados con polipropileno, lo que otorga mayor estabilidad y proporcionan un lugar seguro y confiable para la muestra (Fisherscientific, 2024). Podemos encontrar a los crioviales en presentaciones de 1.0 ml ó 2.0 ml.

2.5.2 CRYOTOP

El Cryotop consiste en una lengüeta de propileno que está unida a un mango de plástico equipada con una pajuela que sirve de protección durante la manipulación y almacenaje. Esta herramienta tiene un volumen de 1µl, cantidad que se considera como el volumen mínimo de la muestra que permite una velocidad de enfriamiento

de 23.000 °C/min (Cobo, 2008), lo cual ha dado resultados favorables en las clínicas de reproducción asistida, pero su costo es más elevado con respecto a crioviales y tiene la desventaja de que no es posible utilizarlo por cuestiones de contaminación de la muestra por agentes patógenos.

3. ANTECEDENTES

3.1. ESTADIO DE DESARROLLO PARA LA VITRIFICACIÓN DE EMBRIONES.

Diversos trabajos han demostrado que la eficiencia de la criopreservación de embriones no sólo depende del método sino también de la especie y etapa de desarrollo, por tal motivo se deben estandarizar los protocolos para cada especie.

Algunos autores aseguran que la criopreservación del embrión en ratón se debe realizar en etapa de mórula (Feng et al., 2009), mientras que de acuerdo con Zhou et al. (2005) la etapa más adecuada para la congelación es la de blastocisto temprano ya que obtuvieron entre un 100% y 98% de supervivencia de los embriones de ratones. En otro trabajo desarrollado por Wilson y Quinn, en 1989, con embriones de ratón en estado de 2 y 8 células tuvieron mejor tolerancia a la criopreservación resultando en un 71% de viabilidad en comparación a los embriones de control. Por otro lado, Hurtado et al. (2008) no recomiendan congelar cigotos en estadio de singamia, lo ideal es congelar entre las 20-22 horas posteriores a la inseminación (período en el que los cigotos han de encontrarse en fase G2), antes de la fusión de los pronúcleos y la condensación cromosómica, ya que en el período de singamia se sintetiza el ADN junto con la formación del huso mitótico y los microtúbulos son sensibles a los cambios de temperatura, lo que podría ocasionar una alteración en la distribución de los cromosomas. Para estos autores, la congelación de embriones humanos se debe realizar en estadios medios de desarrollo (D+2/D+3) en donde, después de su desvitrificación, se han obtenido blastocistos con una supervivencia de un 72% y una tasa de implantación del 14.28%. También en las clínicas de reproducción humana se suelen congelar en

estadio de blastocisto, por medio de vitrificación ultrarrápida, logrando que el 65% de embriones sobrevivan y presentaron un 50% de morfología de buena calidad (Hsieh et al., 1999).

3.2. EFECTOS CITOTÓXICOS

Un efecto negativo reportado en ovocitos causado por la exposición a DMSO durante el proceso de enfriamiento es la liberación prematura de los gránulos corticales y un endurecimiento de la zona pelúcida, lo que compromete la fertilización (Smith & Villa, 2007). Así, Kang et al., en 2017, reportaron que al exponer embriones de 2 células a DMSO éstos mostraron una mayor expresión de genes de respuesta a proteínas como Hspa 5, Hsp90b1, Ddit3, Atf4 y Xbp1, lo que provoca que el desarrollo de muchos embriones se detenga en las etapas de 2 y 4 células o mórula de manera dependiente de la dosis del crioprotector y otros presenten problemas de implantación.

De lo estudiado principalmente en ovocitos, los investigadores han adaptado estrategias y diferentes metodologías para aplicarlas en la vitrificación de embriones, principalmente con combinaciones de crioprotectores no permeables y permeables para disminuir el daño celular o evitar la formación de cristales.

3.3. USO DE MODELOS MURINOS

Ling et al., en 2009, compararon los efectos de la vitrificación sobre el desarrollo de embriones murinos en estadio de mórula y blastocisto, almacenados en cryotop, al utilizar como agentes crioprotectores 7.5% (v/v) de etilenglicol y 7.5% (v/v) de DMSO + 0.5 mol/l de sacarosa del Kit de vitrificación Kitazato (Kitazato BioPharmaceutical, Shizuoka, Japan) y como soluciones de descongelamiento usaron sacarosa 1.0 M (1 min a 37°C), y sacarosa a 0.5 M, con éste método se recuperaron mórulas (95.4%) y blastocistos (96.5%) mostrando integridad celular. Después en el cultivo de embriones para la formación hasta la etapa de blastocisto, el porcentaje de éxito fue significativamente menor para las mórulas vitrificadas (90.3%) con respecto al grupo control no vitrificado (98.4%). Además, las tasas de

eclosión fueron similares, ya que en el grupo de mórulas vitrificadas y el grupo de blastocistos vitrificados fueron del 79.6% y 81%, respectivamente. Estos resultados indican que la vitrificación criogénica de embriones de ratón en la etapa de mórula garantizaría un mayor grado de competencia en el desarrollo posterior al descongelamiento, en lugar del estado de blastocisto.

Otros investigadores como Ishimori et al. (1991), evaluaron la viabilidad de embriones de ratón en estadios de mórula y blastocistos después de la vitrificación, dónde se usaron 6 diferentes mezclas de crioprotectores penetrantes y no penetrantes: Glicerol + etilenglicol (mezcla 1); glicerol + propilenglicol (mezcla 2); glicerol + dimetilsulfóxido (mezcla 3); etilenglicol + propilenglicol (mezcla 4); etilenglicol + dimetilsulfóxido (mezcla 5) y propilenglicol + dimetilsulfóxido (mezcla 6). Los resultados después de la descongelación y rehidratación arrojaron que las tasas de supervivencia para las mórulas fueron mayores para las mezclas 5 y 3 (79 y 78%, respectivamente) y la más baja se registró para la segunda mezcla (16%); por otro lado, encontraron que las tasas de supervivencia de mórulas vitrificadas en las mezclas 3 y 5 fueron mayores que las otras soluciones. Por otro lado, en los blastocistos, las tasas de supervivencia fueron mayores para las mezclas 5 y 1 (79 y 72%, respectivamente) mientras que la menor tasa se registró para la segunda mezcla (29%). La supervivencia de los blastocistos con las mezclas 1 y 5 fueron mayores que las otras soluciones. De acuerdo con los resultados, los embriones vitrificados con la mezcla 5 se transfirieron a ratones receptores y se encontró una supervivencia de desarrollo *in vivo* en el estadio de mórula de un 34%, resultados que fueron similares con respecto al control o la transferencia de embriones frescos donde la tasa fue del 36%. Con respecto a la tasa de desarrollo *in vitro* de embriones vitrificados con etilenglicol + DMSO en estadio de blastocisto fue de 49% y no hubo diferencia ya que en los embriones control su tasa fue de 50%. Estos resultados evidencian que los crioprotectores como el DMSO y etilenglicol son buenos criopreservadores para la vitrificación de embriones de ratón en estadios de mórula y blastocistos.

Por otro lado, Trounson et al. (1987) se han enfocado en investigar protocolos en relación con la concentración de crioprotectores, en el que en uno de ellos compararon el efecto del crioprotector DMSO 2 M + sacarosa con varias concentraciones (0,0.25,0.5,0.6 y 0.75 M), y encontraron una tasa alta de supervivencia del 68% y 87% en las concentraciones de sacarosa 0.25 M y 0.6 M respectivamente, además de que en porcentaje de embriones tempranos que continuaran con el desarrollo a blastocistos, las concentraciones que funcionaron son 0.25 M y 0.5 M con el 55% y 26% con respecto a las otras concentraciones que no mostraron datos. Dentro del mismo trabajo, Ishimori (1991) con sus colaboradores también evaluaron el efecto de la concentración de sacarosa 0.25 M + DMSO a diferentes concentraciones (1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 M), de los cuales en ninguno de los dos factores encontraron efecto, lo que si observaron es que la combinación de sacarosa 0.5 M + DMSO 2.5 M tuvieron bajas tasas de embriones que llegaron a blastocisto, con tan sólo el 2%. Concluyeron que el uso de sacarosa parece ser necesario para que los embriones logren desarrollarse después de la desvitrificación, ya que funciona como un soluto extracelular que causa la deshidratación.

También Wilson y Quinn (1989) usaron DMSO a 1.5 o 3.5 M combinado con sacarosa 0.25 M en embriones de ratón F1 híbrido en los estadios de 1, 2 y 8 células en donde evaluaron la supervivencia, el desarrollo de los embriones *in vitro* e *in vivo*, en donde observaron que la concentración de 1.5 M de DMSO+0.25 M de sacarosa no protegió a las células después de la descongelación. Por otro lado, la concentración de 3.5 M de DMSO+0.25 M de sacarosa dio como resultado altas tasas de supervivencia y desarrollo con el método de varios pasos de descongelación. De este modo, los embriones unicelulares alcanzaron un 71% de supervivencia, 35% de desarrollo *in vitro* y un 10% de viabilidad *in vivo*. En cuanto a los embriones de 2 células, alcanzaron el 87% de supervivencia, 77% de desarrollo *in vitro* y 66% de viabilidad *in vivo* y para finalizar, los embriones de 8 células tuvieron una supervivencia de 97%, 87% de desarrollo *in vitro* y un 62% de viabilidad *in vivo*. Por lo tanto, los autores concluyeron que para las etapas de 2 y 8

células los resultados fueron favorables con respecto al grupo no congelado que tenían un 71% de viabilidad *in vivo*, por lo que ese método y mezcla de crioprotectores es viable y rápido.

3.4. HUMANOS

Ahora bien, en cuanto a trabajos enfocados a la práctica de vitrificación en humanos Liebermann (2008), señala que la vitrificación de blastocistos por medio de la herramienta de Cryotop es una técnica eficaz que está asociada a tasas altas de embarazo y de implantación de tal manera que es un abordaje clínico seguro, ya que los lactantes resultantes son sanos y carentes de anomalías. En este trabajo, los autores trabajaron con Etilenglicol/DMSO al 7.5% (Concentración baja) seguido de Etilenglicol/DMSO al 15% en sacarosa 0.5 M (Concentración alta) para vitrificar blastocistos de dos grupos, uno al día 5 de desarrollo y el otro al día 6 de desarrollo, que fueron almacenados en Cryotop. Posteriormente, al calentamiento, sobrevivió el 96% de los blastocistos vitrificados el día 5 de desarrollo (1020/1062) y el 96% de los blastocistos vitrificados el día 6 de desarrollo (916/954), lo que indica que no existen diferencias en el porcentaje de supervivencia después de la vitrificación entre ambos estados de desarrollo. Además, los porcentajes de embriones vitrificados en los días 5 y 6 de desarrollo que llegaron a parto fueron del 91.6% y 90.2%, respectivamente, sin que se observara alguna diferencia entre ambos grupos.

Por lo anterior, los investigadores se han encargado de buscar aquellos dispositivos para la criopreservación que permitan potenciar el proceso de vitrificación, minimizando el volumen de los crioprotectores que alberga la muestra con el fin de que se reduzca el espesor de la capa de vapor (efecto Leidenfrost-barrera térmica) y se incremente la velocidad de enfriamiento. (Liebermann, 2008) y es por eso que algunos han trabajado con herramientas como crioviales, cryoloop, cryotop o pajillas de vidrio.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La congelación de células germinales ha tenido un gran auge en los últimos años, sobre todo en la industria ganadera, laboratorios de investigación y en la clínica humana para retrasar la paternidad o en casos donde los pacientes tienen comprometida su calidad espermática por cuestiones de trabajo o salud, como en pacientes que serán sometidos a quimioterapia. Además, en la actualidad, se utilizan cada vez más protocolos de vitrificación o de congelación tradicional (lenta), porque es la que más se ha estudiado y el método por excelencia para algunos embriólogos. Sin embargo, en todos los protocolos publicados nos indican que no todas las células sometidas a criopreservación son recuperadas y viables después de un tiempo de cultivo. Ya que el reto más importante a superar es la formación de hielo durante la vitrificación, fenómeno que ocurre en el rango de temperatura entre los -5°C y -80°C lo que provoca el daño mecánico o ruptura de toda la estructura celular.

Además, se ha reportado que no todos los crioprotectores son adecuados en diferentes concentraciones por su efecto citotóxico (porque los tiempos de exposición son muy largos o cortos) y que en diferentes protocolos que usan distintas herramientas de almacenaje no tienen la capacidad de proteger en su totalidad a los embriones en diferentes etapas de desarrollo del frío.

5. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas el criopreservar embriones, principalmente en humanos, ha tenido resultados exitosos para obtener recién nacidos vivos; sin embargo, el porcentaje de supervivencia y viabilidad morfológica son más bajas que el porcentaje de implantación de embriones en fresco que han reportado diversos investigadores y clínicas de reproducción asistida; esto es porque existe un alto riesgo de que la calidad embrionaria se vea comprometida debido a daños criogénicos provocados por los cambios extremos de temperatura, la fuerza mecánica o daño osmótico durante el proceso de congelación y descongelación;

dando como resultado embriones con baja calidad con aneuploidías o que expresen muerte celular prematura.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es contribuir en la mejora de los protocolos de vitrificación ultrarrápida, encontrando un protocolo que considere el uso de dos combinaciones de crioprotector no permeable con un permeable almacenados en dos herramientas de almacenaje con volúmenes distintos, y que más tarde éste trabajo pueda estandarizarse y extrapolar a clínicas de reproducción asistida o para su uso con otras especies, buscando el aumento de la calidad embrionaria.

6. HIPÓTESIS

El uso de la combinación de un crioprotector permeable y uno no permeable, junto con el uso de un dispositivo que mantenga un menor volumen de crioprotector en los embriones almacenados a -196°C , mantendrán la viabilidad e integridad celular de los embriones de ratón de la cepa CD-1 después de su desvitrificación.

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar qué tipo de almacenamiento y qué combinación de crioprotectores (permeables y no permeables) preserva la viabilidad de los embriones de ratones de la cepa CD-1 al ser vitrificados ultrarrápidamente.

7.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la viabilidad y desarrollo de embriones de ratones de la cepa CD-1 después de su vitrificación al usar un crioprotector compuesto por 4.5 M de dimetilsulfóxido (permeable) con 0.25 M de sacarosa (no permeable), al utilizar Criotop como herramienta de almacenaje.
- Determinar la viabilidad y desarrollo de embriones de ratones de la cepa CD-1 después de su vitrificación al usar un crioprotector compuesto por 4.5 M de

dimetilsulfóxido (permeable) con 0.25 M de sacarosa (no permeable), al utilizar crioviales como herramienta de almacenaje.

- Determinar la viabilidad y desarrollo de embriones de ratones de la cepa CD-1 después de su vitrificación al usar un crioprotector compuesto por 4.5 M de etilenglicol (permeable) con 0.25 M de glucosa (no permeable), al utilizar Criotop como herramienta de almacenaje.
- Determinar la viabilidad y desarrollo de embriones de ratones de la cepa CD-1 después de su vitrificación al usar un crioprotector compuesto por 4.5 M de etilenglicol (permeable) con 0.25 M de glucosa (no permeable), al utilizar crioviales como herramienta de almacenaje.

8. METODOLOGÍA

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Todos los experimentos se realizaron con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se utilizaron ratones hembra y macho de la cepa CD-1 de 10 semanas de edad y 25 g de peso, mantenidos en el Bioterio Claude Bernard de la BUAP, bajo condiciones estándar de bioterio y acceso libre al agua y alimento.

Se realizaron 8 experimentos, en cada uno de ellos se usaron 2 hembras y un macho. Se obtuvieron ovocitos de las hembras a las que previamente se les indujo superovulación, se realizó una fertilización *in vitro* y los embriones desarrollados fueron criopreservados con dos diferentes crioprotectores y dos diferentes herramientas de almacenaje.

8.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

De los 8 experimentos realizados se obtuvieron 288 ovocitos de 32 ovarios de hembras *Mus musculus* de la cepa CD-1 a las que se les indujo superovulación.

Obteniendo 94 embriones que se vitrificaron por técnica ultrarrápida con una de dos combinaciones crioprotectoras (DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25M o Etilenglicol 4.5 M+ glucosa 0.25M) almacenadas en dos diferentes herramientas (Criovial o Cryotop) como se observa en la figura 6.

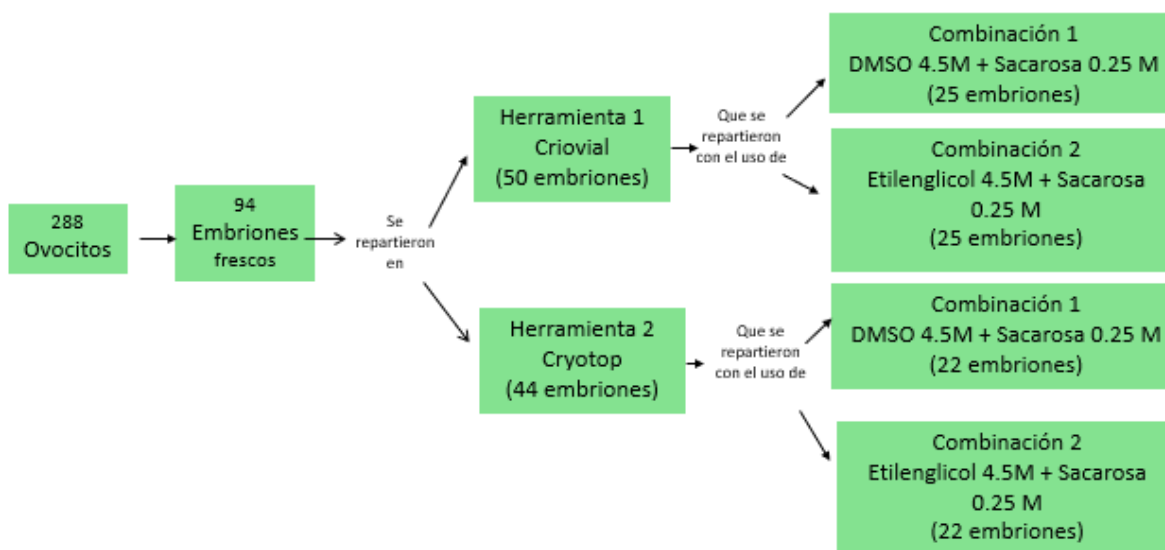


Fig. 6. Diagrama que ilustra como se trabajó la vitricación ultrarrápida de embriones y la cantidad de embriones recuperados después de la desvitrificación.

8.2. INDUCCIÓN DE SUPEROVULACIÓN

Para la inducción de la ovulación, se administró 5 U.I. de gonadotropina coriónica de yegua preñada (PMSG) por vía intraperitoneal (IP) y 48 horas más tarde, se administró 5 U.I. de gonadotropina coriónica humana (hCG) por vía IP.

8.3. OBTENCIÓN DE OVOCITOS

Las hembras fueron sacrificadas 16 horas después de la administración de hCG, haciendo uso de una cámara de CO₂. Posteriormente, se realizó la disección abdominal para localizar los ovarios y recuperar las asas de los cuernos uterinos, los cuales se colocaron en una caja Petri de 3 cm de diámetro que contenía medio CZB-H a una temperatura de 37°C. El tejido de las asas se rompió con la ayuda de dos agujas delgadas para la liberación de los ovocitos ovulados (Figura 7).

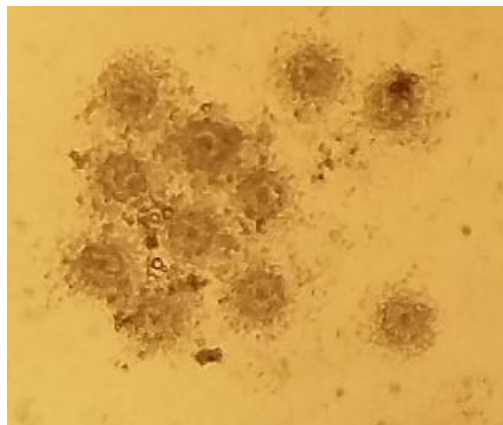


Figura 7. Imagen de microscopia estereoscópica de ovocitos ovulados, obtenidos por inducción hormonal a una hembra de la cepa CD-1 (*Mus musculus*).

Los ovocitos se recuperaron y se colocaron en cajas Petri estériles con medio CZB, donde se incubaron por 3 horas en una incubadora a 37°C en atmósfera húmeda y CO₂ al 5% para la estabilización y eliminación de células foliculares (decumulación de los ovocitos).

8.4. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Los ratones macho se sacrificaron con cámara de CO₂ y por medio de una disección abdominal se extrajeron los testículos y los epidídimos. Los epidídimos se separaron del resto del tejido y se lavaron con medio CZB-H a 37°C. Posteriormente, se realizó un corte profundo en la cola del epidídimo y con una jeringa delgada se perfundió el conducto deferente con 1 ml de medio CZB a 37°C para la recuperación de los espermatozoides en tubos Eppendorf. Posteriormente, los espermatozoides se capacitaron al incubarlos en medio CZB-H adicionado de albúmina al 4%, por una hora a temperatura de 37°C en la incubadora de CO₂ (figura 8).

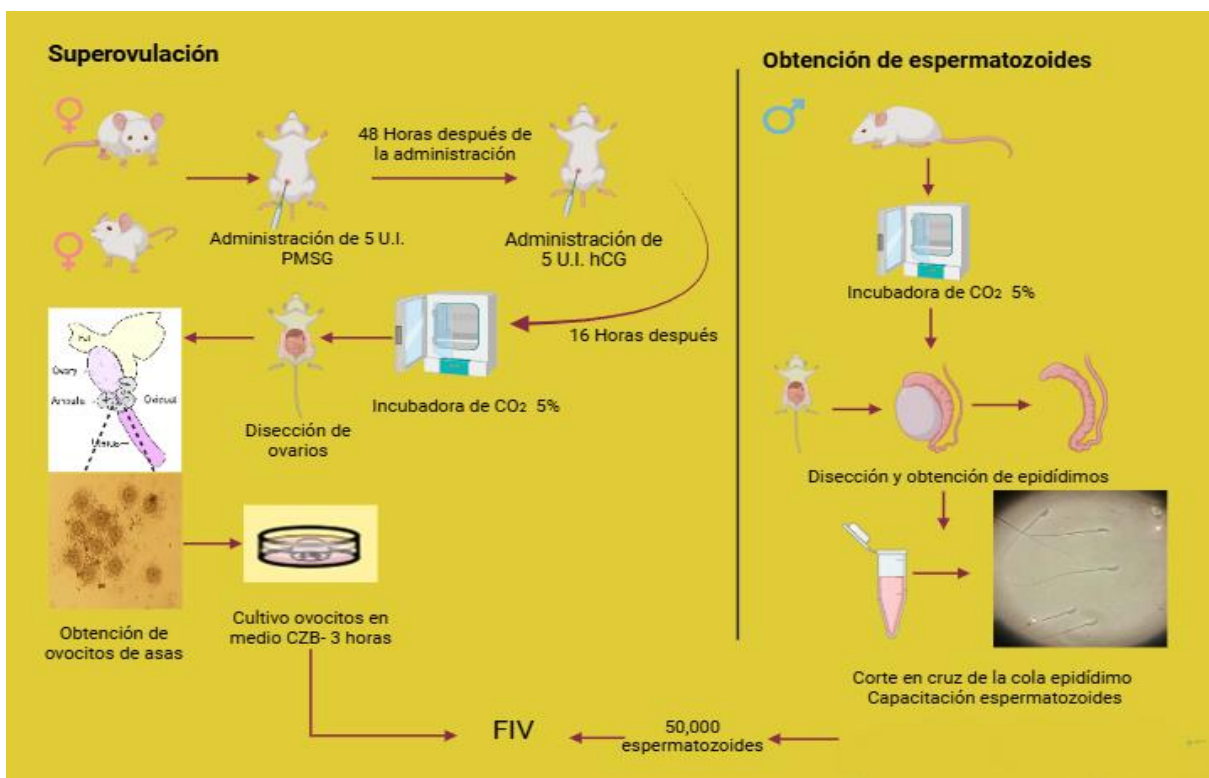


Figura 8. Diagrama de la metodología para la inducción de la superovulación y la obtención de espermatozoides de ratón, para la realización de FIV de ratones de la cepa CD-1 (*Mus musculus*).

8.5. FERTILIZACIÓN *in vitro* (FIV)

Para realizar la FIV, se prepararon cajas Petri con gotas de 80 μ L de medio CZB distribuidas en la superficie de la caja y cubiertas con aceite mineral. Las cajas se prepararon con 24 horas de antelación para que el medio se atemperara a 37°C y estabilizara en atmósfera de CO₂. Los ovocitos de óptima calidad se seleccionaron con base en su morfología, ya que debían presentar una forma redondeada, con un grosor de zona pelúcida óptima de alrededor de 20 μ m, libres de vacuolas, no tener un espacio perivitelino aumentado debían encontrarse en la etapa de M-II (presencia del primer cuerpo polar, sin fragmentación) y se descartaron los ovocitos que mostraban anomalías de acuerdo a los criterios como se muestran en la figura 9, los cuales fueron tomados según la clasificación de la morfología de embriones de acuerdo con la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR, 2015).

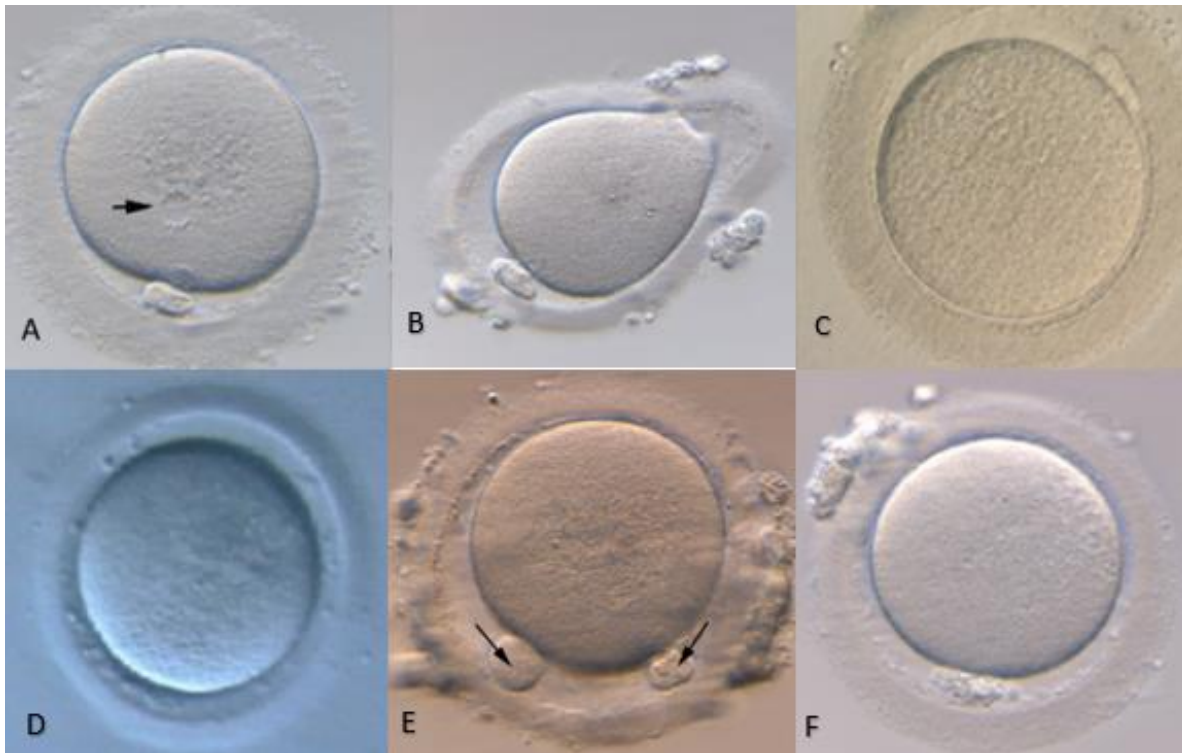


Figura 9. Ovocitos con diferentes anomalías que son desfavorables ya que comprometen un adecuado desarrollo embrionario. Se puede apreciar la presencia de vacuolas (A); una zona pelúcida no circular (B), una zona pelúcida gruesa de tamaño $>20\ \mu\text{m}$ (C); el espacio perivitelino aumentado (D); la presencia de doble corpúsculo polar (E); y un corpúsculo polar fragmentado (F). *Adaptado de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos (2015).*

En cada gota de medio se colocó un ovocito y 50,000 espermatozoides capacitados ($10\ \mu\text{l}$). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%. Después de 24 horas, se confirmó si hubo fecundación observando la presencia de un cigoto con pronúcleos o de un embrión en etapa de dos células. Los embriones desarrollados se pasaron a una nueva gota de medio HTF para su posterior desarrollo embrionario por 24 horas (etapa de 4 células), momento en el que se realizó la vitrificación ultra rápida de los embriones.

8.6. PROTOCOLO DE VITRIFICACIÓN Y ALMACENAMIENTO

Los embriones desarrollados en el día 2 de incubación (D+2, 48 hr), correspondiente a la etapa de 4 células, se seleccionaron de acuerdo con los siguientes parámetros

que considera ASEBIR (2015): Ritmo de división y número celular, que en D+2 corresponde a que el embrión posea 4-5 blastómeras de tamaños similares en combinación del grado de fragmentación.

El porcentaje de fragmentación celular se determinó visualmente de acuerdo con sus porcentajes de fragmentos con respecto al volumen y distribución del espacio embrionario en el que se encontraron. La clasificación de fragmentación se dividió en cuatro, donde el embrión se clasifica como:

- de grado I: el embrión de mejor calidad ya que <10% de área embrionaria con fragmentos y división celular regular en número y visualmente del mismo tamaño entre blastómeras;
- de grado II: entre 10%-25%;
- de grado III entre 25%-35% y por último
- de grado IV >35%.

En este trabajo se seleccionaron los embriones que se encontraban en los grados I, II y III como se ilustra en la figura 10.

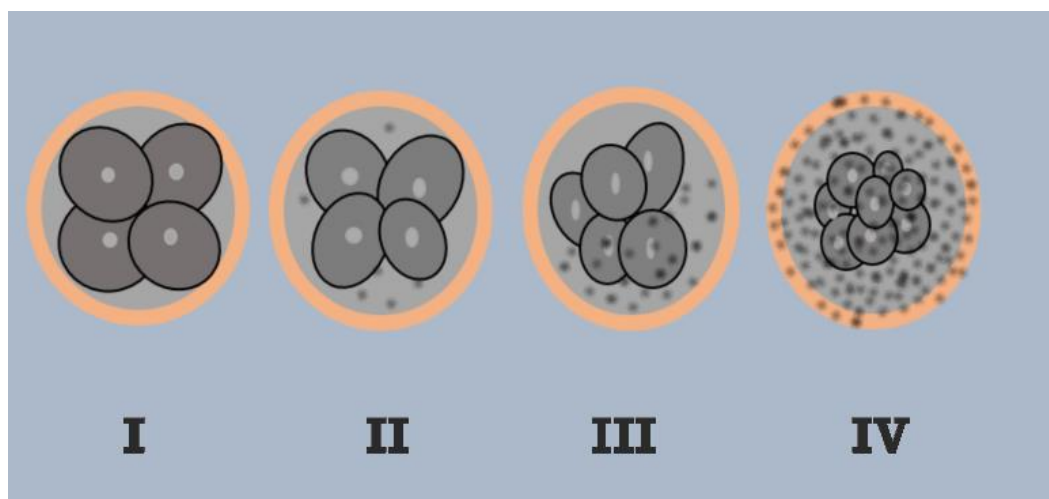


Figura 10. Ilustración de la clasificación de la morfología de embriones de acuerdo con ASEBIR (2015). Se consideraron cuatro categorías: I <10%, II: 10%-25%, III: 25%-35% y IV: >35%.

Además, se estableció que los embriones seleccionados no presentaran el anillo citoplasmático, no hubiera presencia de vacuolas de tamaño considerablemente visible o similar al tamaño de blastómeras, no tuvieran un citoplasma moteado y que la zona pelúcida no se encontrara septada, que no fueran circular, o que sea gruesa y oscura, como se observan en la figura 11, que ilustra ejemplos de anomalías embrionarias para el estadio D+2.



Figura 11. Representación de embriones con diferentes anomalías que son desfavorables ya que comprometen la implantación. Se puede apreciar A) un embrión con fragmentación >50% tipo IV; B) el anillo citoplasmático indicado con flechas; C) una zona pelúcida gruesa; D) una zona pelúcida oscura; E) citoplasma moteado y F) la presencia de vacuolas. *Nota. Adaptado de Criterios ASEBIR (2015).*

8.7. VITRIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES

En este protocolo se elaboraron dos soluciones crioprotectoras compuestas de una combinación de un agente permeable (DMSO o etilenglicol) con uno no permeable (sacarosa o glucosa); donde la solución 1 se formó por DMSO en concentración 4.5

M + sacarosa a 0.25 M disueltos en medio HTF; y la solución 2 se compuso por etilenglicol en concentración 4.5 M + glucosa a 0.25 M disueltos en medio HTF.

8.8. VITRIFICACIÓN CON EL MÉTODO DE CRYOTOP

Los embriones seleccionados se colocaron en el pozo No. 1 de una placa de vitrificación con 300 μ l de una solución de HTF a una temperatura de 37°C por 15 minutos (Figura 12). Posteriormente, se transfirieron (a media profundidad) al pozo No. 2 con 150 μ l de medio HTF + 150 μ l de cada uno de los crioprotectores a 37°C, en donde permanecieron por 40 segundos. Se retiraron de ese medio y se colocaron en el siguiente pozo (No. 3) con 300 μ l de la solución de crioprotectores; donde los embriones se mantuvieron por 30 segundos.

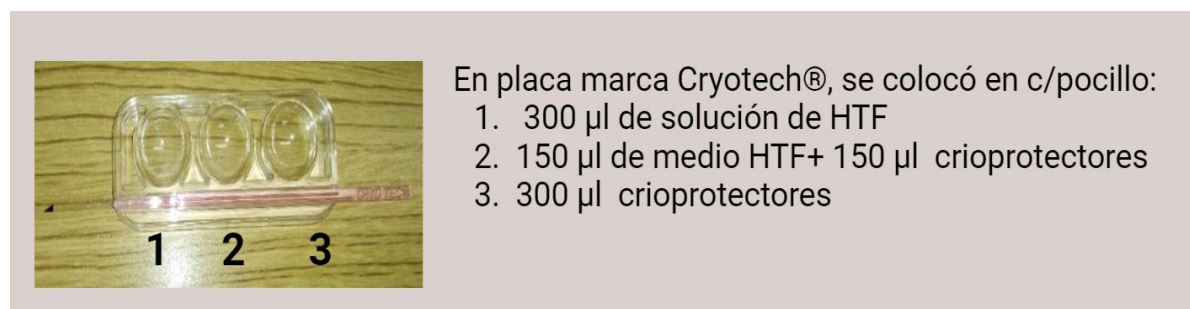


Figura 12. Placa de vitrificación marca Cryotech® utilizada junto con el orden de las soluciones del protocolo.

Seguido de este tiempo, los embriones se colocaron y almacenaron en Criotop de la marca Cryotech® de volumen 1 μ l o en crioviales marca Corning Incorporated CORNING® con un volumen de muestra de 5 μ l y posteriormente se sumergieron directamente en nitrógeno líquido (-196°C) (MVE Millennium 2000 xc 20), como se puede apreciar en la ilustración de la figura 13.

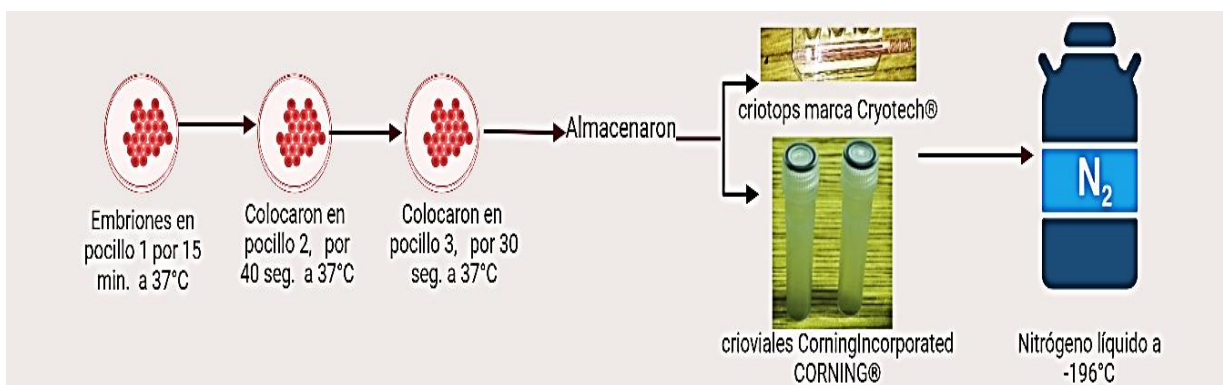


Figura 13. Pasos de la vitrificación realizados.

8.9. DESVITRIFICACIÓN

En el protocolo de descongelamiento para la eliminación del crioprotector se ocuparon las mismas soluciones descritas para la vitrificación; compuestas de una combinación de un agente permeable (DMSO o etilenglicol) con uno no permeable (sacarosa o glucosa); donde la solución 1 se formó por DMSO en concentración 4.5 M + sacarosa a 0.25 M disueltos en medio HTF; y la solución 2 se compuso por etilenglicol en concentración 4.5 M + glucosa a 0.25 M disueltos en medio HTF.

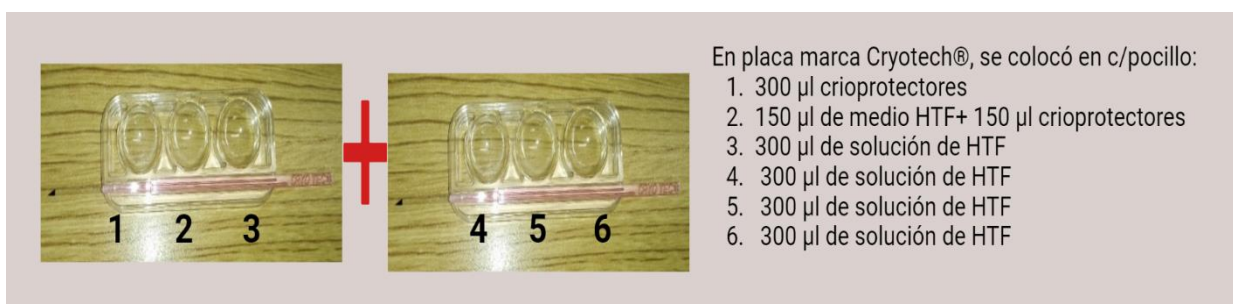


Figura 14. Se muestra el orden de las soluciones en las placas de desvitrificación marca Cryotech® de este protocolo.

Los embriones almacenados en los criotop o en los crioviales se retiraron del nitrógeno líquido de manera inmediata, se recuperaron de cada uno de los contenedores de almacenamiento y se colocaron en dos placas de Cryotech® (figura 14) con los medios para la desvitrificación, empezando por el primer pozo con 300 µl de solución crioprotectora (la misma en el momento de la congelación) atemperada de 37°C. Los embriones fueron mantenidos por 3 minutos en el primer

pozo, después se traspasaron al siguiente pozo con 150 µl de medio crioprotector +150 µl de medio HTF en donde permanecieron por 1 minuto (con el fin de iniciar la recuperación morfológica del embrión) para permitir el reingreso del agua a las células y reactivar el metabolismo celular (figura 15).

Desvitrificación

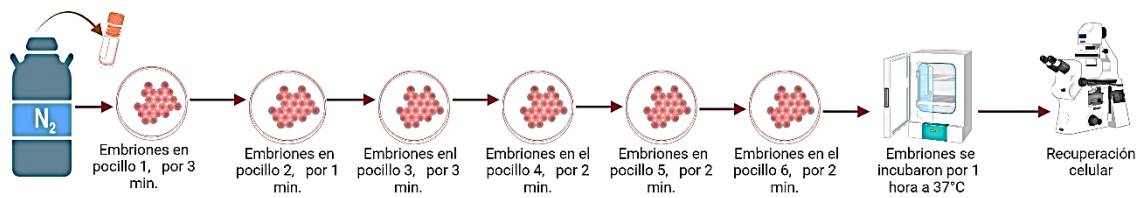


Figura 15. Pasos realizados para la vitrificación de embriones

Terminado el tiempo, los embriones se trasladaron al tercer pozo, con 300 µl de medio HTF y se incubaron por un tiempo de 3 minutos. Después, los embriones se pasaron por otros tres lavados en gotas de 300 µl con solución HTF, permaneciendo 2 minutos en cada lavado. Al final los embriones se cultivaron por una hora en incubadora de CO₂ a 37°C con la finalidad de revisar su recuperación y reactivación metabólica al observarlos por microscopia de fases con el objetivo 40x (figura 16).

Recuperación de embriones durante la desvitrificación

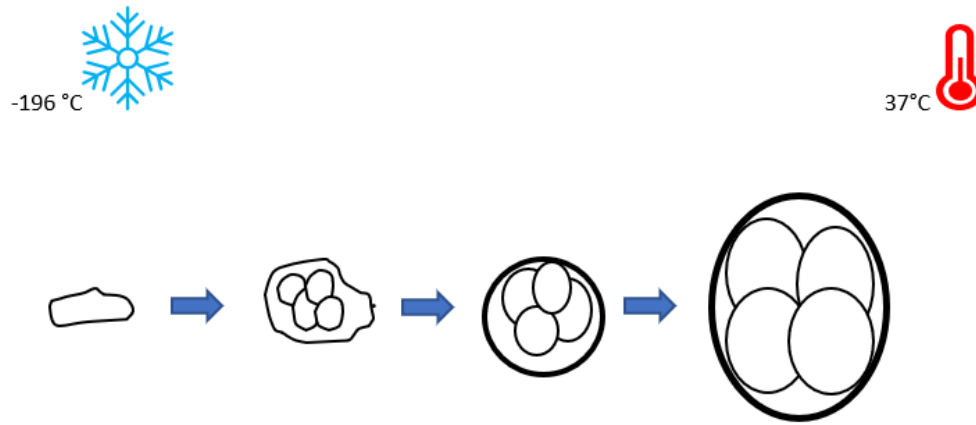


Figura 16. Proceso de desvitrificación. Inicialmente tenemos un embrión en estado hipotónico y compacto, los embriones al experimentar gradualmente el cambio de concentraciones de solutos y el cambio de temperatura, el agua traspasa las membranas plasmáticas de las células por gradiente de concentración, lo cual permite la recuperación del volumen y morfología inicial reactivando el metabolismo del embrión.

8.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron para revisar si se ajustaban a una distribución normal y si presentaban varianzas iguales. Al no cumplir con estas condiciones se eligió realizar las comparaciones entre grupos mediante una prueba no paramétrica (U de Mann-Whitney) con el programa IBM SPSS Statistics versión 30.0.0.0 (172) con significancia definida por $p < 0.05$.

9. RESULTADOS

En los 8 experimentos realizados, se obtuvo un total de 288 ovocitos ovulados por inducción hormonal de 32 ovarios, de los cuales se partió para realizar la fertilización *in vitro*.

De la fertilización *in vitro*, se obtuvieron 94 embriones en etapa de 4 células (D+2, 48 hr) que fueron seleccionados por su morfología (categorías I, II y III), para su vitrificación. De estos embriones, 25 se almacenaron en crioviales con la solución crioprotectora DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25 M, y otros 25 embriones se almacenaron en crioviales con la solución etilenglicol 4.5 M + glucosa 0.25 M. Por otro lado, 22 embriones fueron almacenados en criotops con el uso de DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25 M, así como otros 22 embriones se almacenaron con el uso de etilenglicol 4.5 M + glucosa 0.25 M.

EMBRIONES RECUPERADOS DE LA DESVITRIFICACIÓN

1) USANDO CRIOVIALES

Después de realizar la desvitrificación, se determinó la supervivencia embrionaria a través de la recuperación e integridad morfológica (principalmente la presencia de zona pelúcida íntegra). Se recuperó el $27.5\% \pm 11.91$ (media $\pm$ SEM) de embriones con el uso de DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25 M almacenados en crioviales, así como el $13.87\% \pm 5.44$ de los embriones con el uso de etilenglicol 4.5 M + glucosa 0.25 M de igual manera almacenados en crioviales (figura 17).

RECUPERACIÓN DE LA MORFOLÓGIA EMBRIONARIA DESPUÉS DE LA
DESVITRIFICACIÓN CON EL USO DE CRIOVIAL COMO MEDIO DE ALMACENAJE

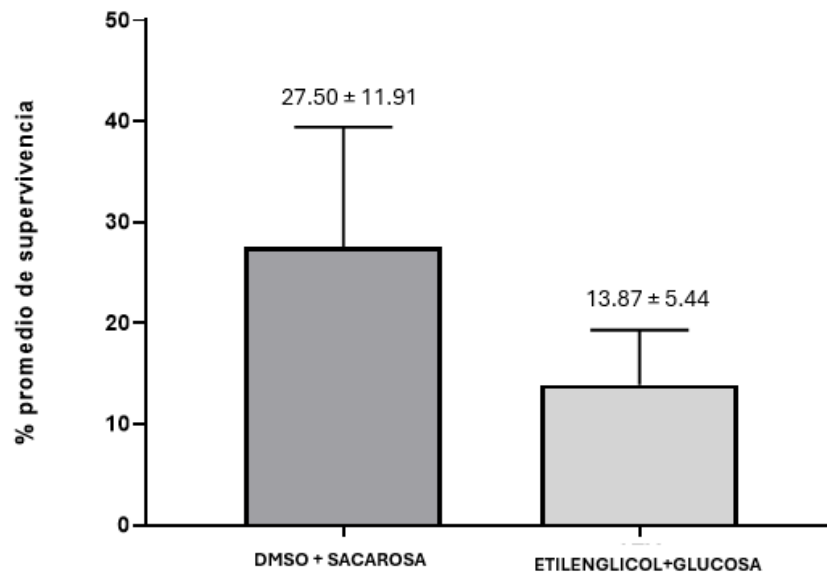


Figura 17. Porcentaje promedio de embriones que se recuperaron morfológicamente después de la desvitrificación, usando los crioviales como método de almacenaje.

En la imagen 18 se puede apreciar dos embriones (distintos) recuperados de la desvitrificación que fueron almacenados en Criovial.

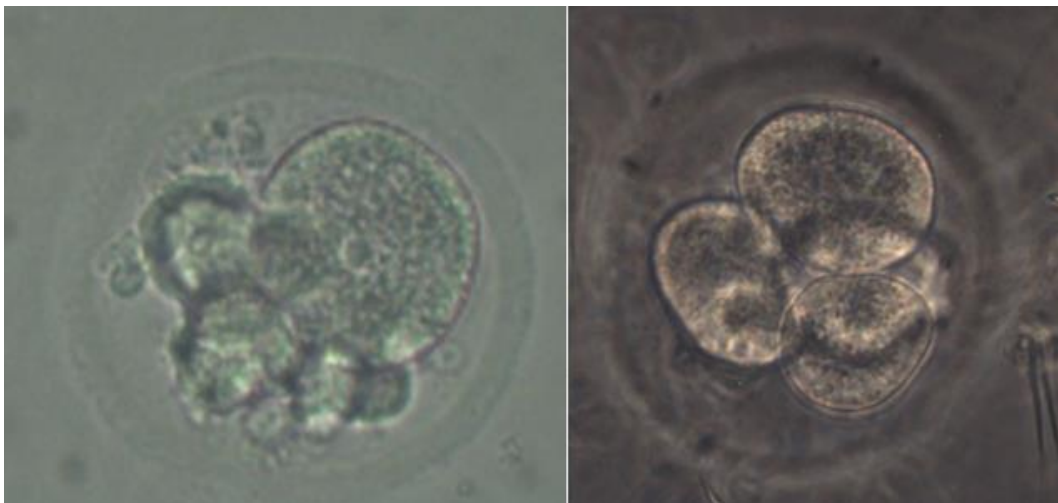


Figura 18. Embriones vitrificados (categoría IV y III, respectivamente) con el crioprotector DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25 M, almacenados en criovial y recuperados de la desvitrificación.

2) USANDO CRYOTOP

De los embriones desvitrificados almacenados en cryotop con el uso de DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25 M se recuperó el $24.88\% \pm 13.69$ (media $\pm$ SEM) de embriones, mientras que con el uso de etilenglicol 4.5 M + glucosa 0.25 M no se recuperaron embriones.

En la figura 19 se observa un ejemplo de embrión recuperado después de la desvitrificación con el uso de Cryotop y DMSO 4.5 M + 0.25 M.



Figura 19. Embrión (categoría II) vitrificado con el crioprotector DMSO 4.5 M + 0.25 M sacarosa, almacenado en nitrógeno líquido con el uso Criotop y recuperado de la desvitrificación.

Respecto a los embriones desvitrificados de etilenglicol 4.5 M + sacarosa 0.25 M, sólo se lograron recuperar las blastómeras de un 20% de 22 embriones que fueron vitrificados ($n= 4$), debido a la fractura de la zona pelúcida que recuperaron volumen en medio HTF en un tamaño por encima del que tendrían normalmente si estuvieran contenidas por la zona pelúcida, como se ilustra en la figura 20 embriones sin zona pelúcida.

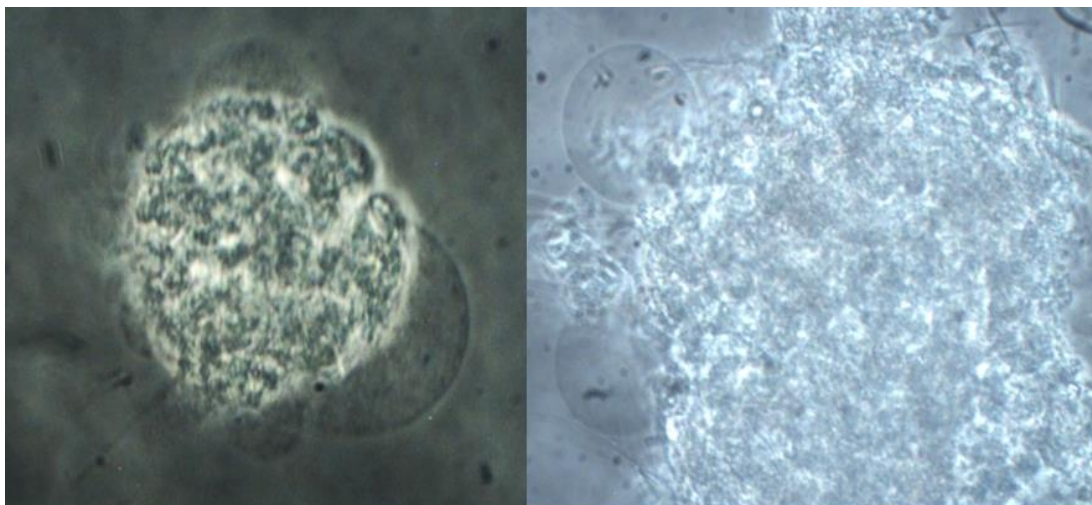


Figura 20. Embriones vitrificados con el crioprotector etilenglicol 4.5 M + glucosa 0.25 M, almacenados en criovial y recuperados de la desvitrificación en los que se puede apreciar la ruptura de la zona pelúcida por presencia de blastómeras expuestas, y con la acumulación excesiva de restos celulares que se adhirieron.

Además, se encontraron casos de embriones con exceso de células de la granulosa o residuos de estas, que no fueron eliminadas durante la incubación para la decumulación de estas células antes de la FIV y aun con la manipulación prevalecieron después de la desvitrificación, lo que complicó la visibilidad de algunos embriones cómo se ilustra en la figura 20 en la imagen de la derecha.

EFFECTO DE LA MEZCLA DE CRIOPROTECTORES

Al utilizar la prueba de U de Mann-Whitney se observó que el uso de DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25 M *versus* el uso de etilenglicol 4.5 M + glucosa 0.25 M; no se encontraron diferencias significativas en el efecto de cada mezcla ($U= 96.50$, $Z= -1.366$, $p= 0.239$) con un efecto pequeño ($r= -0.24$).

EFFECTO DEL MÉTODO DE ALMACENAJE

También para comparar el efecto del método de almacenaje (cryotop vs criovial) cuando se usó la mezcla de DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25 M se realizó la prueba de U de Mann-Whitney y no se encontró diferencia significativa entre ambos grupos ($U=30.50$, $Z= -0.168$, $p= 0.878$) con un efecto medio ($r= 0.5$).

Finalmente, con respecto al efecto del uso de etilenglicol 4.5 M + sacarosa 0.25 M almacenados en las diferentes herramientas no se pudo realizar el análisis estadístico por la falta de datos ya que no se pudo recuperar ningún embrión.

10. DISCUSIÓN

En el pasado, las estrategias de criopreservación de embriones se han basado en la velocidad de congelación (lenta o rápida) para evitar la formación de cristales de hielo durante los procesos de congelación y calentamiento, conocidos como el congelamiento lento y la vitrificación. De estas, la vitrificación está teniendo mayor auge en la actualidad, donde su principal objetivo es que el procedimiento sea rápido para evitar la formación de cristales. Sin embargo, existen otros fundamentos a probar que intervienen en los resultados, para encontrar un protocolo óptimo que proporcione altas tasas de supervivencia embrionaria, un desarrollo adecuado y que terminen en nacimientos vivos. Dos de estos factores que se deben probar son la estrategia de la concentración de crioprotectores y el usar una herramienta de almacenamiento de bajo volumen, que eviten la formación de cristales en conjunto con el método de vitrificación ultrarrápida.

En este trabajo se buscó encontrar si la combinación de dos agentes crioprotectores, uno permeable y otro no permeable, elevan las tasas de supervivencia y viabilidad celular de los embriones. En el caso del uso de crioprotectores en la combinación DMSO y sacarosa a concentraciones de 4.5 M y 0.25 M, respectivamente, y el uso de etilenglicol y glucosa al 4.5 M y 0.25 M, respectivamente, se encontró que funcionan de la misma manera en la supervivencia celular, obteniendo tasas similares del 24.88 - 27.5% para DMSO y sacarosa; y para etilenglicol + glucosa sólo el 13.87%. Ya que no existen diferencias significativas en ambos tratamientos, sólo se puede observar una tendencia en donde la combinación de DMSO + sacarosa podría ser la opción viable para estudiar

el efecto de usar concentraciones más altas y observar los efectos de supervivencia y desarrollo embrionario.

Estos resultados son similares a los reportados por Trouson et al., en 1987, quienes no encontraron diferencias al usar combinaciones de sacarosa 0.25 M + DMSO en concentraciones de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 M al igual que la combinación de sacarosa 2.5 M + DMSO en concentraciones de 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 y 4.0 M. Esto quiere decir que esas concentraciones no protegieron al embrión de la disminución de la temperatura, provocando probablemente daños a nivel de microtúbulos del huso meiótico al causar su despolimerización, lo que puede ser la causa de una segregación cromosómica inadecuada en la división celular (Cobo, 2008) generando cigotos aneuploides y que, como consecuencia, los embriones congelados no recuperen su viabilidad y mucho menos que lleguen a un desarrollo hasta blastocisto. Por ende, que no sean capaces incluso de lograr la implantación, o si lo llegan a lograr el producto podría tener alteraciones cromosómicas serias que podrían afectar su calidad de vida a futuro.

En contraste con los resultados del presente trabajo y lo que mencionan Trounson et al. (1987), Wilson y Quinn (1989) obtuvieron mejores resultados con el uso de la combinación de DMSO 3.5 M + sacarosa 0.25 M, y su trabajo se centró en el fundamento de evitar la formación de cristales de hielo y en la eliminación de los crioprotectores, con una solución de sacarosa 0.25 M + medio de cultivo en varios pasos (Liebermann, 2008), a diferencia de nuestro trabajo se utilizaron las mismas soluciones para la vitrificación y para la desvitrificación se usaron lavados de sacarosa + DMSO seguido solo de sacarosa y finalmente medio de cultivo, en donde parece ser que la sacarosa es viable para la eliminación de los agentes crioprotectores utilizados en la vitrificación para la conservación de embriones de ratón.

Aunque sólo se recuperaron el 13% de embriones con el uso de etilenglicol 4.5 M + glucosa 0.25 M almacenados en Criovial, probablemente se deba al efecto únicamente del etilenglicol, ya que de manera individual, de acuerdo con Miyamoto

e Ishibashi (1977) es eficaz; y la glucosa no protegió a las células, ya que se ha reportado que su uso como crioprotector en embriones de *Rhinelepis aspera*, no protegió a los embriones congelados de esta especie (Fornari et al., 2011).

En cuanto a la herramienta de almacenaje para los embriones con la combinación de los crioprotectores DMSO + sacarosa, en los crioviales y cryotop encontramos que funcionan igual ya que se recuperó casi la misma cantidad de embriones (27.5% y 22.88%, respectivamente), si bien se esperaba que fuera más alto con cryotop; ya que en la literatura los centros de fertilidad reportan que la vitrificación mediante el uso del dispositivo Cryotop es muy eficaz ya que se relaciona con las altas tasas de embarazo y de implantación, lo que da lugar a lactantes sanos y carentes de anomalías. En estos centros siguen un protocolo de vitrificación de blastocistos usando Cryotop con un volumen mínimo de 0.1 μ l (Liebermann, 2008); lo que evita que las células se deshidraten en exceso y presenten daño osmótico.

En contraste a esa aseveración, Seki et al. (2018) obtuvieron resultados satisfactorios con respecto a la vitrificación de embriones de ratón con el uso de un crioprotector diferente (etilenglicol + Ficoll sacarosa) pero almacenados en crioviales en un volumen de 5 μ l, en donde reportan el desarrollo hasta blastocisto y un 43 % de los embriones transferidos llegaron a término. Usando un método similar Fukuda et al. (2021), tuvieron éxito al vitrificar embriones de rata en un volumen de 5 μ l con la misma mezcla de crioprotectores que Seki et al. (2018) en donde llegaron a obtener un 50% de implantación, una tasa similar a los embriones control en sus experimentos. En el presente trabajo observamos que el cryotop con volumen de muestra de 0.1 μ l parece ser una herramienta óptima a diferencia del uso de los crioviales, ya que un factor importante para alcanzar el punto vítreo de las soluciones es la velocidad a la que se enfrían las muestras y al estar contenidas por un dispositivo elaborado con un tipo de material que puede retrasar esa velocidad (Liebermann, 2008) se corre un alto riesgo de que se formen los cristales de hielo o la muestra se deshidrate hasta un nivel irreversible, causando la ruptura

de la zona pelúcida o la fusión de los lípidos de las membranas de los organelos y se presente un daño genético (por ejemplo, la activación de genes de la apoptosis, o aneuploidías).

Finalmente, en la experiencia en el laboratorio observamos que el criovial es una herramienta que, al tener un volumen de gran tamaño, ocasiona que las muestras se pueden adherir fácilmente a las paredes causando de este modo la pérdida de los embriones, por lo que derivado de los resultados obtenidos se recomienda el uso del criotop o la búsqueda de otros tipos de herramientas para seguir realizando investigaciones con diferentes concentraciones de DMSO + Sacarosa.

11. CONCLUSIÓN

Se concluye que los embriones de ratón criopreservados en DMSO 4.5 M + sacarosa 0.25 M y almacenados a -196 °C en cualquiera de las dos herramientas (criovial o cryotop) presentan un mejor porcentaje de supervivencia embrionaria en comparación con el uso de las otras combinaciones de crioprotectores.

Se requiere seguir investigando sobre estas técnicas para alcanzar tasas más altas de recuperación embrionaria y lograr el desarrollo del embrión hasta blastocisto y su posterior implantación que den como resultado una preñez y nacimiento exitoso de los ratones, en miras de poder extrapolar estas metodologías a las clínicas de reproducción asistida humana.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2010). *Toxicological Profile for Ethylene Glycol*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp96.pdf>
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts K, & Walter, P. (2010). *Biología molecular de la célula* (5ta.). Ediciones Omega, S.A.
- Ali, J., & Shelton, J. N. (1993). Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 2(99), 471-477. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0990471>
- Allinger, N., Cava, M., Jongh, D., Lebel, N., & Stevens, C. (1984). *Química orgánica*. (Segunda edición). Reverté.
- Álvarez, J. (2007). Historia contemporánea: Las técnicas complejas de reproducción asistida. *Ginecología y Obstetricia de México*, 75(5).
- Arrazola, A. (1994). Biología de la membrana celular. *NEFROLOGÍA*, XIV(4).
- Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Lozano, J., & Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300.
- ASEBIR. (2015). ASEBIR Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción: Cuadernos de embriología clínica. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. (3.a ed.).
- Bautista, J., & Kanagawa, H. (1998). Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 45(4), 183-191. <https://doi.org/10.14943/jjvr.45.4.183>
- Bailey, P.S. (2001). *Química orgánica: conceptos y aplicaciones*. Pearson Educación, 2001 ISBN 9701701208, 9789701701201

- Cabrera, P., & Fernández, A. (2006). Criopreservación de embriones: Una herramienta básica en la reproducción asistida. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV.*, 47(2), 59-70.
- Chen, C. (1986). PREGNANCY AFTER HUMAN OOCYTE CRYOPRESERVATION. *The Lancet*, 327(8486), 884-886.
- Cobo, A. (2008). Criopreservación de ovocitos: Congelación lenta y vitrificación. *Cuadernos de Medicina Reproductiva*, 14(13).
- Córdova, A., Guerra, J., Villa, A., Olivares, J., Cansino, G., Juárez, M., & Pérez, J. (2015). Congelación de embriones bovinos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 9(2), 22-40.
http://dx.doi.org/10.5209/rev_RCCV.2015.v9.n2.51041
- Feng, X., Quiang, J., Ren, S., Cheng, J., Peng, Y., Guo, X., Chin, B., Quing, G., & Wang, X. (2009). Effect of cryotop vitrification on preimplantation developmental competence of murine morula and blastocyst stage embryos. *Reproductive Biomedicine Online*, 19(5), 708-713.
- Fisherscientific. (2024, noviembre 9). *Corning Viales criogénicos de rosca interna—Viales, Viales para almacenamiento criogénico* [Portal.]. Fisherscientific. <https://www.fishersci.es/shop/products/corning-internally-threaded-cryogenic-vials-15/10418571>
- Fornari, D., Pereira, R., Streit, D., Cesar, L., Ribeiro, P., Oliveira, D., & Nardez, R. (2011). Effect of cryoprotectans on the survival of cascudo preto (*Rhinelepis aspera*) embryos stored at -8°C. *Cambridge University*, 58-63.
<https://doi.org/10.1017/50967199411000517>
- Fukuda, Y., Higashiya, M., Obata, T., Okamoto, Y., Nishijima, K., & Seki, S. (2021). Small-volume vitrification and rapid warming yield high survivals of one-cell rat embryos in cryotubes. *Biology of reproduction*, 1-9.
<https://doi.org/10.1093/biolre/10ab059>
- Guzmán, L., Pella, R., Arguello, B., Seminario, J., Quispe, J., Zúñiga, C., & Pommer, R. (2008). Criopreservación de embriones al tercer día de desarrollo in vitro San Isidro, Perú. *Revista Sociedad Peruana de Obstetricia y Ginecología*, 54(2), 117-120.

- Hernández, P. (2016). *Presencia de posibles crioprotectores (Glucosa y Glicerol) en el anfibio anuro, Pleuroderma thaul (Lesson, 1826) sometidos a estrés por frío*. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas.
- Hsieh, Y., Tsai, H., Chang, C., Lo, H., & Lai, A. (1999). Ultrarapid cryopreservation of human embryos: Experience with 1,582 embryos. *Fertility and sterility*, 72(2), 253-256. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00257-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00257-5)
- Hurtado, M., Díaz, R., Gallego, A., & González, A. (2008). Congelación de embriones. Método lento. *Cuadernos de Medicina Reproductiva*, 14(3), 26.
- Ishimori, H., Takahashi, Y., & Kanagawa, H. (1991). Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Department of Theriogenology. Faculty of Veterinary Medicine Hokkaido University, Sapporo 060, Japan*.
- Jérez, L. (2008). *Control de la inversión de la sacarosa en el proceso de elaboración de jarabe simple de bebidas carbonatadas*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Kang, M., Das, J., Gurunathan, S., Park, H., Song, H., Park, C., & Kim, J. (2017). The cytotoxic effects of dimethyl sulfoxide in mouse preimplantation embryos: A mechanistic study. *Theranostics*, 7(19). <https://doi.org/10.7150/thno.21662>
- Kuwayama, M., Gandhi, G., Kagalwala, S., & Ramani, R. (2014). Vitrification: An Overview. *Vitrification in Assisted Reproduction*, 1-7. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1527-1_1
- Lazcano, J., Maldonado, I., López, P., Dabbah, J., Moreno, D., Bermúdez, A., & Gaytán, J. (2010). Estudio clínico comparativo. Resultado de la vitrificación y desvitrificación de embriones humanos con dos tipos de sistemas abiertos: Cryotop vs Cryolock. *Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción*, 2(3), 79-83.
- Liebermann, J. (2008). Vitrificación de blastocistos humanos. Fertility Centers of Illinois, Kingsbury, Chicago, EEUU. *Cuadernos de Medicina Reproductiva*, 14(3).
- Liebermann, J., Tucker, M. J., Graham, J. R., Han, T., Davis, A., & Levy, M. J. (2002). Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the

- Flexipet denuding pipette. *Reproductive BioMedicine Online*, 4(2), 146-150.
[https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61932-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61932-3)
- Ling, X., Zhang, J., Cao, S., Chen, J., Peng, Y., Guo, X., Heng, B., Toun, G., & Wang, X. (2009). Effect of cryotop vitrification on preimplantation developmental competence of murine morula and blastocyst stage embryos. *Reproductive biomedicine online*, 19(5), 708-713.
- Miyamoto, H., & Ishibashi, T. (1977). Survival of frozen thawed mouse and rat embryos in the presence of ethyleneglycol. *Journal of reproduction and fertility*, 50(2), 373-375. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560373>
- Palma, G. (2001). *Biotecnología de la reproducción*. (primera edición). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
- Parry, R. (1974). *Química. Fundamentos experimentales. Guía del profesor*. Reverté.
- Polge, C. (1952). Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degrees C. *Nature*.
- Ramírez, J., Landívar, S., Pesántez, J., & Rodríguez, D. (2017). Efecto de agentes crioprotectores no permeables y uno comercial sobre las características físicas de semen bovino postdescongelación. *Maskana*, 8(Número Especial).
- Rivero, J., & Risco, R. (2012). *Modelado matemático e implementación práctica de sistema de vitrificación ultra-rápida mediante radiación láser* (file:///C:/Users/eceve/Downloads/PROYECTO_COMPLETO%20vitrificaci%C3%B3n.pdf) [Proyecto Fin de Carrera.]. Universidad de Sevilla.
- Rosemberg, E. (2009). *Congelación de óvulos y embriones*. Medica Panamericana S.A.
- Sakai, A., & Engelmann, F. (2007). Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. *CryoLetters*, 28(3), 151-172.
- Seki, S., Basaki, K., Komatsu, Y., Fukuda, Y., Yano, M., Matsuo, Y., Obata, T., Matsuda, Y., & Nishijima, K. (2018). Vitrification of one-cell mouse embryos in cryotubes. *Cryobiology*, 81, 132-137.

- Smith, G., & Villa, L. (2007). *Potential developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. Vitrification in Assisted Reproduction. A user's manual and trouble-shooting guide.*
- Trounson, A., Perua, A., & Kirby, C. (1987). Ultrarapid freezing: A new low cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil. Steril*, 48, 843-850.
- Vajta, G., Kuwayama, M., & Vanderzwalmen, P. (2007). *Disadvantages and benefits of vitrification. Vitrification in Assisted Reproduction. A user's manual and trouble-shooting guide.*
- Vajta, G., & Yovich, J. (2008). Principios fundamentales de Criobiología. Introducción a la congelación lenta y vitrificación. *Cuadernos de Medicina Reproductiva*, 14(3), 9-21.
- Vara, A., & Gil, L. (2011). *Criopreservación de células y tejidos. Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa.* Visión Libros.
- Wilson L., & Quinn P. (1989) Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. *Human Reproduction*. 4(1) 86-90.
- Zegers, F., Crosby, J., & Salas, S. (2014). Fundamentos biomédicos y éticos de la criopreservación de embriones. *Revista Médica Chile*.
- Zhou, G., Hou, Y., Jin, F., Yang, Q., Yang, Z., Quan, G., & Tan, H. (2005). Vitrification of mouse embryos at various stages by open-pulled straw (OPS) method. *Animal Biotechnology*. <https://doi.org/10.1080/10495390500263831>