



**UNIAGRARIA**

Fundación Universitaria Agraria  
de Colombia

LA U VERDE DE COLOMBIA

**IMPORTANCIA DE LA VITRIFICACION DE EMBRIONES EN LA INDUSTRIA  
EQUINA, UNA REVISION DE LITERATURA.**

**GERMAN FRANCISCO RAMIREZ FORERO.**

**SANTIAGO ORTIZ GARCIA.**

**MARIA JOSE ROJAS CUBILLOS.**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS – MEDICINA VETERINARIA.**

**FUNDACIÓN UNIVERSITARIA AGRARIA DE COLOMBIA.**

**DIPLOMADO EN BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN BOVINA Y  
EQUINA.**

**BOGOTA, D.C.**

**2024**

## Resumen

La industria equina es un sector que posee una gran importancia dentro la economía y la sociedad a nivel mundial, donde ciertas razas de nuestra zona gozan de un especial significado a nivel socio-cultural. Por ello es un sector en el que se debe aumentar la conservación, producción y desarrollo de su especie; En las últimas décadas, la transferencia de embriones ha adquirido una gran notoriedad en el sector, consiguiendo que la genética materna llegue a comercializarse de manera similar al semen de los sementales. Sin embargo, los resultados obtenidos en la criopreservación de embriones equinos no son del todo satisfactorios, debido a las características anatómicas y fisiológicas propias de la especie equina. El avance en esta técnica y, por tanto, la mejora de los resultados, supondría una serie de ventajas en el sector: por un lado, se produciría un mayor número de crías al año de la yegua y/o semental deseados; por otro, sería posible el nacimiento de potros cuyas madres poseen problemas que le imposibilitan el parto o yeguas que se encuentren compitiendo, sin la necesidad de tener que dejar de ampliar su palmarés; además, se facilitaría la comercialización internacional de material genético, sin tener que transportar animales para ello, solo embriones, etc.

## **Abstract**

The equine industry is a sector of great importance in the global economy and society, where certain breeds in our region hold special socio-cultural significance. Therefore, it is a sector in which the conservation, production, and development of its species should be increased. In recent decades, embryo transfer has gained great prominence in the sector, making maternal genetics available for commercialization in a similar way to stallion semen. However, the results obtained in the cryopreservation of equine embryos are not entirely satisfactory, due to the anatomical and physiological characteristics of the equine species. Advancement in this technique and, therefore, improvement in results would provide a number of advantages in the sector: on the one hand, a greater number of desired mare and/or stallion offspring would be produced each year; on the other hand, foals could be born whose mothers have problems that prevent them from giving birth or mares that are competing, without the need to stop expanding their awards; in addition, it would facilitate the international marketing of genetic material without having to transport animals, only embryos, etc.

## Tabla de Contenido

<b>Resumen</b> .....	2
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Introducción</b> .....	5
<b>Objetivos</b> .....	8
<b>Objetivo General</b> .....	8
<b>Objetivos Específicos</b> .....	8
<b>Marco de Referencia</b> .....	9
<b>Historia de la Criopreservación de Embriones</b> .....	9
<b>Biología, Desarrollo y Cinética Embrionaria</b> .....	9
<b>Evaluación Embrionaria</b> .....	11
<i>Clasificación de los Embriones</i> .....	12
<b>Criopreservación</b> .....	13
<i>Tipos de Crioprotectores</i> .....	13
<i>Congelación y Descongelación Lenta</i> .....	15
<i>Vitrificación</i> .....	16
<i>Descongelación Embriones Vitrificados</i> .....	19
<i>Concentración y Tiempo de Exposición a los Crioprotectores</i> .....	20
<i>Micromanipulación del embrión</i> .....	20
<b>Factores que Influyen en la Vitrificación de Embriones</b> .....	21
<i>Calidad, Tamaño y Edad del Embrión</i> .....	21
<i>Toxicidad de los Crioprotectores</i> .....	21
<b>Métodos y técnicas de trabajo</b> .....	22
<b>Revisión sistemática y analítica</b> .....	22
<b>Conclusiones y Recomendaciones</b> .....	24
<b>Bibliografía</b> .....	26

## Introducción

El sector ganadero equino posee gran importancia dentro la economía y la sociedad a nivel mundial, diversas razas y ejemplares del entorno conservan características especiales, que las hace llamativas para su producción y desarrollo. Con el fin de optimizar o aumentar la eficiencia reproductiva de los animales se implementan múltiples técnicas de reproducción asistida adaptadas a la especie, tales como: Inseminación artificial, transferencia embrionaria, fertilización in vitro, congelación lenta de embriones, vitrificación, criopreservación de esperma, aspiración folicular, clonación, entre otras.

La principal problemática que incentivó la invención de nuevas técnicas para la obtención de embriones en la especie equina fue la baja eficacia de los protocolos de superovulación, ya que solo era posible obtener un embrión por lavado, con tasas de recuperación entre el 50% y el 70%. (Squires, 2016)

A raíz de esto, se crean técnicas como la aspiración folicular donde los ovocitos se extraen directamente de los ovarios de la yegua por vía transvaginal, para su posterior inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), brindando la posibilidad de obtener más de un embrión por ciclo, donde estos son cultivados hasta su etapa de transferencia o bajo criopreservación. En los casos donde no se cuenta con un número suficiente de receptoras en programas de transferencia embrionaria, la criopreservación es método muy útil para resolver dicha problemática, ya que permite el correcto almacenamiento por periodos largos de tiempo de los embriones hasta que se cuente con una hembra receptora disponible.

Scofield (2015) afirma que al tener un embrión criopreservado, se reúnen diferentes características y ventajas, como lo son: la preservación del valioso potencial genético de una combinación particular entre yegua y semental, así mismo facilita el manejo de la hembra receptora debido a que se suprime la necesidad de una cierta sincronía entre la hembra donante y la hembra receptora, la vitrificación también permite importar o exportar genética en forma de embriones en lugar de animales vivos, a su vez posibilita la producción temprana de potros, congelando así los embriones a finales de verano y otoño, para realizar su transferencia a principios de año.

En la actualidad existen dos técnicas para la criopreservación de embriones, la congelación lenta y la vitrificación, donde la congelación lenta se fundamenta en utilizar concentraciones bajas de crioprotectores, los cuales son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, el descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente (Ávila et al., 2006), existen crioprotectores penetrantes (por ejemplo, el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y propanediol (PROH) y criopreservadores no penetrantes (por ejemplo, sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano) (Ávila et al., 2006), pero en consecuencia requiere de bastante tiempo, por lo que para ello se utilizan equipos programables, esta técnica mantiene un balance entre los factores que causan los cristales, el daño osmótico, el efecto tóxico de los crioprotectores, la alteración de los citoesqueletos, concentraciones de electrolitos intracelulares, los daños producidos por frío, la fractura de la zona pelúcida y las alteraciones de los organelos internos del embrión. (Hendriks et al., 2014)

La técnica de vitrificación se considera una técnica de congelación ultrarrápida diferente a la congelación lenta, ya que ha demostrado evitar la formación de cristales de

hielo durante el proceso de crioconservación, eliminando así totalmente los daños mecánicos que estos producen al embrión; se basa en la utilización de altas concentraciones de crioprotectores para así proteger y conservar la arquitectura embrionaria. (Rusciano et al., 2017).

En este trabajo se pretende realizar una revisión de literatura actualizada acerca de los avances en la criopreservación de embriones equinos, con la finalidad de recopilar información útil que permita establecer puntos clave para la vitrificación embrionaria y de este modo inferir sobre su importancia en la industria equina.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Realizar una revisión literaria sobre la vitrificación de embriones equinos y determinar el impacto que ha generado la implementación de este tipo de biotecnologías reproductivas en la industria equina desde su invención hasta la fecha.

### **Objetivos Específicos**

Describir la importancia de la vitrificación de embriones entre las biotecnologías reproductivas registradas en literatura en equinos.

Identificar la importancia de esta biotecnología reproductiva y cuáles son sus ventajas ante la técnica de congelación lenta.

Mencionar los avances en la criopreservación de embriones equinos desde la invención de la técnica hasta la fecha.

## **Marco de Referencia**

### **Historia de la Criopreservación de Embriones**

Según Ortiz (2017) Las bases de la criopreservación se establecen a finales del año 1940, con el descubrimiento del efecto protector del glicerol para la congelación de semen, esto marcó el comienzo de una era en la que se desarrollaron métodos prácticos para congelar o almacenar diversos tejidos y órganos, sin embargo pasaron más de dos décadas antes de que se informara sobre la criopreservación exitosa de un embrión de mamífero, después de este primer informe nacen crías obtenidas de embriones criopreservados en diferentes especies, siendo el reporte del primer potro nacido por criopreservación en 1982.

“Los principales métodos de criopreservación de gametos y embriones son la congelación convencional [...] y la vitrificación” (Vizueté, 2016, pp 50)

### **Biología, Desarrollo y Cinética Embrionaria**

Comprender la biología embrionaria en las yeguas resulta indispensable para poder aplicar las diferentes biotecnologías reproductivas que permitan optimizar técnicas enfocadas a la reproducción, es por esto que autores como (Cortes et al., 2018) mencionan que, Las yeguas suelen ovular un único folículo entre 28 a 48 horas antes de finalizar el estro, allí es donde se lleva a cabo la monta natural o la inseminación artificial.

Dentro del tracto reproductivo de la yegua, el semen es sometido a diversos cambios, en primer lugar, se tiene la capacitación, donde el espermatozoide adquiere la capacidad de atravesar la capa externa de la zona pelúcida, una vez el espermatozoide ingresa, el ovocito genera diversos cambios los cuales no permiten el ingreso de otros espermatozoides, a partir de aquí, se fusionan los pronúcleos del espermatozoide y del ovocito para obtener la información genética del nuevo embrión. (Atares, 2020)

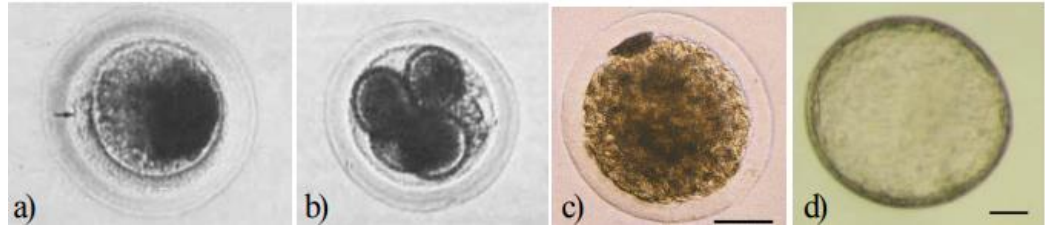
A lo largo de todo este tiempo el embrión se encuentra en el oviducto, en el día 5/6 post ovulación el embrión desciende al útero encontrándose en estadio de mórula compactada a blastocisto temprano, donde comienza la formación de fluido que llena la cavidad del blastocele y produce el adelgazamiento de la zona pelúcida, según Marenzi (2015) luego de que el embrión ingresa al lumen uterino, este crece exponencialmente hasta blastocisto expandido; allí una capa de mucina es depositada en la superficie interna de la zona pelúcida, a su vez se forma una capsula constituida por una glucoproteína elástica y resistente que envuelve el blastocisto entre los días 6 y 22, la cual mantiene la configuración esférica del embrión brindándole protección física durante el tiempo que está sujeto a contracciones miométricas, así mismo acumula los componentes de las secreciones exocrinas de las glándulas endometriales tomándolas como nutrientes para el embrión móvil, de este modo el embrión libera señales antiluteolíticas de reconocimiento materno de gestación a toda la superficie del endometrio. (Marenzi, 2015).

La fijación del embrión se suele dar en la base de uno de los dos cuernos uterinos en el día 35-60 (Cortés et al., 2018), previamente a la fijación, desde el día 12 post ovulación el conceptus produce progesterona, lo que da como resultado un aumento en el tono uterino y por lo tanto una señal de gestación temprana, si se produce un fallo en la señal de reconocimiento materno el endometrio secretara prostaglandina, la cual viajara por sangre para ocasionar una regresión del cuerpo lúteo lo que resultaría en un fallo de implantación y no habría gestación. (Atares, 2020)

En la Figura 1, es posible evidenciar los diversos cambios y estadios del embrión equino, siendo la imagen a) el día 0: 12 h post ovulación; b) día 2: 48 h post ovulación; c) mórula diferenciada; d) día 7: blastocisto expandido de grado 1. (Marenzi, 2015)

## Figura 1

### *Estadios del embrión equino*



*Nota.* a) Día 0: 12 hs post ovulación; b) Día 2: 48 hs post ovulación; c) Día 6: Mórula indiferenciada; d) Día 7: Blastocito expandido de grado 1. Tomado de (Marenzi, 2015).

### **Evaluación Embrionaria**

Según (Marenzi, 2015) “Los embriones recolectados, son sometidos a un proceso de evaluación inmediata, donde se obtiene información importante y la posibilidad de inferir sobre la supervivencia del embrión después de su transferencia, se evalúa morfología, tamaño, estado de desarrollo, células degeneradas, color, número de células compactadas, y presencia o ausencia de la capsula.”

A continuación, en la Tabla 1 se describe la variación del tamaño del embrión equino, según el día post ovulación.

**Tabla 1**

*Diámetro de los embriones equinos recuperados del lumen uterino.*

<b>Día post ovulación.</b>	<b>Tamaño promedio (mm)</b>	<b>Rango (mm)</b>
6	0.28	0,13-0,75
7	0.40	0,13-1,46

8	1.13	0,12-3,98
9	2.22	0,73-4,52

*Nota.* Aspectos operativos en transferencia embrionaria equina y análisis del potencial de la tecnología de criopreservación. Tomada de (Marenzi, 2015)

Según afirma (Marenzi, 2015) “Los embriones equinos pueden ser recuperados entre los días 6 y 9 post ovulación, sin embargo, los días óptimos para llevar a cabo luego la transferencia embrionaria, son el séptimo y el octavo. En el caso de la congelación del embrión, el día óptimo es el sexto.”

### **Clasificación de los Embriones**

- ✓ Grado 1: Forma esférica, células, color y tamaño uniforme, es considerado de óptima calidad con máxima capacidad de implantación.
- ✓ Grado 2: Se pueden encontrar blastómeros extrusionados, y con forma irregular, sin embargo, los embriones son buenos.
- ✓ Grado 3: Corresponde a embriones que tienen una calidad justa para la transferencia, pero suelen tener problemas graves de blastómeros extruidos, células degeneradas o blastocelos colapsados.
- ✓ Grado 4: Son considerados embriones pobres, con las alteraciones mencionadas anteriormente y adicional a esto una capa muy fina de células que lo hacen poco viable.
- ✓ Grado 5: En este grado se sitúan los embriones totalmente degenerados o muertos. (Atares, 2020)

Las tasas de gestación varían dependiendo el grado del embrión, los embriones de calidad 1 y 2 poseen más o menos la misma ratio de transferencia, los de calidad 3 y 4 poseen un bajo ratio de gestación y un alto porcentaje de perdidas gestacionales en el caso que esta se establezca. (Atares, 2020)

## **Criopreservación**

La criopreservación es un proceso dinámico durante el cual intervienen una serie de factores físicos y químicos, como la presión osmótica e hidrostática, el contenido intracelular iónico, el pH y la temperatura. (Ortiz, 2017)

A pesar de no ser el único método, este es el más óptimo, para preservar un embrión a largo plazo, es la criopreservación, esta permite dissociar tanto el tiempo como la recolección de embriones y la transferencia de los mismos, se basa en el uso de temperaturas muy bajas para preservar células y tejidos intactos; las células se pueden almacenar a una temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  sin que se produzca ningún efecto letal, ya que el proceso no permite la difusión acuosa y la energía térmica es insuficiente para que se produzcan reacciones químicas. (Ortiz, 2017)

La criopreservación de células y tejidos vivos se encuentra en dos categorías básicas, la congelación lenta y la vitrificación, estos parecen permitir la preservación solamente de embriones pequeños, de un diámetro menor a 300 $\mu\text{m}$ . (Marenzi, 2015)

### ***Tipos de Crioprotectores***

Los crioprotectores son compuestos orgánicos que reducen el punto de congelación de una solución acuosa aumentando su viscosidad, se clasifican en permeables y no permeables, en los permeables se incluyen el Dimetilsulfóxido (DMSO), Glicerol, Propilenglicol (PG), Etilenglicol (EG) y Metanol, los cuales son capaces de atravesar la membrana embrionaria y proporcionar protección intracelular y extracelular.

La adición de un crioprotector hace que el medio sea hiperosmótico, lo que resulta en una deshidratación celular, debido a la diferencia de concentraciones entre el crioprotector, el espacio intracelular y extracelular, este comienza a impregnar la célula por difusión simple, y de este modo el agua comienza a ingresar a la célula para mantener

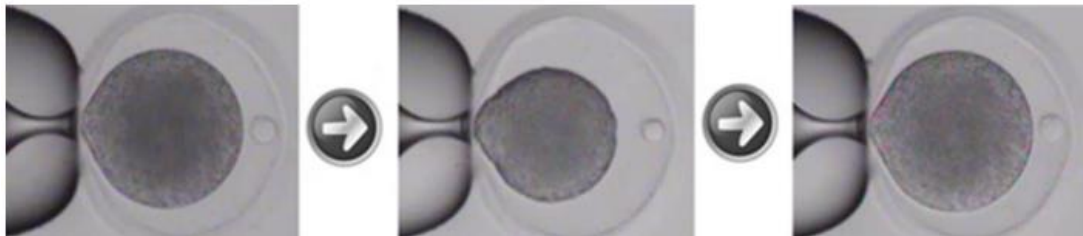
la homeostasis, (Ortiz, 2017), a continuación, en la figura 2 se pueden evidenciar algunos cambios en los ovocitos tras la exposición a crioprotectores.

En el grupo de los crioprotectores no permeables también llamados no penetrantes, se encuentran los monosacáridos como lo son la galactosa, disacáridos como la sacarosa, polisacáridos como dextranos, y polímeros como alcohol polivinílico. (Urias y Boeta, 2022)

Estos protegen mediante deshidratación, estabilización de bicapas lipídicas o proteicas, o pueden cambiar las propiedades del agua; cuando los embriones son expuestos a mono o disacáridos las células responden osmóticamente perdiendo agua, estos no atraviesan la membrana y las células permanecen contraídas cuando se alcanza el equilibrio. (Ortiz, 2017)

## Figura 2

*Cambios de volumen osmótico de un ovocito después de la exposición a crioprotectores*



*Nota.* Tomada de (Ortiz, 2017)

En el caso del etilenglicol, dimetilsulfóxido y propilenglicol realizan su función entrando a la célula reemplazando el agua intracelular, modificando sus características fisicoquímicas y su respuesta ante el descenso de la temperatura, impidiendo la formación de hielo. (Izquierdo et al., 2015)

## ***Congelación y Descongelación Lenta***

La congelación lenta consta del uso de concentraciones bajas de crioprotectores de 1.35-1.5M y rangos controlados de enfriamiento entre -80 y -196°C, (Phillips y Jahnke, 2016), con el fin de reemplazar lentamente el agua intracelular, los crioprotectores utilizados para esta técnica son el glicerol y el etilenglicol, el cual es considerado ideal por que posee alta capacidad de penetración y baja toxicidad, Pegg (2015). Este procedimiento con o sin el uso de azúcares tales como la sacarosa funcionan generando presión osmótica extracelular ayudando al intercambio de agua intracelular, permitiendo menor formación de cristales de hielo durante la congelación de las células, puesto que estos cristales perforan la membrana celular o separan las células provocando la destrucción mecánica. (Phillips y Jahnke, 2016)

Las principales desventajas que presenta la congelación lenta son el tiempo que tarda en congelar un embrión, que es aproximadamente 2 horas, y la necesidad de un costoso congelador celular programable, (Squires, 2016), lo cual a nivel de campo lo convierte en una limitante y la especialidad de la reproducción, para lo que es necesario evaluar otras técnicas optimizadas.

Según el protocolo descrito por (Umair et al., 2023), los embriones se incuban en glicerol al 5% durante 5 minutos, luego se dejan durante 20 minutos en glicerol al 10%, a una temperatura de 19-21°C, se carga el embrión. en una pajita de 0,25 ml, cuyo extremo abierto se sella térmicamente para insertarlo parcialmente en una pajita exterior etiquetada de 0,5 ml (para identificación), que se cubre con papel de aluminio para proteger de la luz hasta que se congele, la pajita con el embrión se coloca en un baño de etanol en una máquina congeladora programable (circulador de enfriamiento en cascada de 2 etapas) a una temperatura de -6,5°C durante 5 minutos, luego se induce tocando ligeramente la pajita con pinzas metálicas pre-enfriadas en nitrógeno líquido, para

observar la cristalización y continuar con la congelación lenta, luego de este proceso, la pajita se sumerge y se almacena en nitrógeno líquido hasta su descongelación.

Para la descongelación las pajillas se mantienen 8 minutos a temperatura ambiente, luego se sumergen en baño maría a 32 °C/2 min. Se vacía el contenido de la pajilla en una placa Petri que contiene PBS con 10 % de suero fetal + 0.2 M de sucrosa para su rehidratación por 5 min. (Cassa, 2018)

### ***Vitrificación***

Es un método de enfriamiento ultrarrápido, que evita la formación de los cristales de hielo en el espacio intracelular y extracelular del embrión, generando una solidificación del líquido similar al vidrio, esto tiene la ventaja de ser rápido y sencillo, pero expone al embrión a altas concentraciones de crioprotectores, con bajos volúmenes de medio vítreo (dificulta un poco su manejo durante el proceso), en un tiempo corto de incubación, seguido de la sumersión directa en nitrógeno líquido. Este método busca generar una alta viscosidad y la rápida solidificación de las soluciones de vitrificación con el fin de disminuir la toxicidad del crioprotector. (Marenzi, 2015)

Para este proceso las soluciones más usadas son el dimetilsulfóxido (DMSO), polietilenglicol y glicerol, Phillips y Jahnke (2016). El éxito de la vitrificación depende de tres factores claves: la velocidad de enfriamiento, la alta concentración de los crioprotectores añadidos a la solución de vitrificación, comparado con las concentraciones que se usan en la congelación lenta y el volumen de la muestra. (Xueli et al., 2015)

El proceso de vitrificación consiste en:

- Exposición del material a criopreservar a soluciones de vitrificación con concentraciones ascendentes de crioprotectores disueltos en un buffer en presencia o no de crioprotectores no permeables. La última solución, con la

concentración de crioprotector más elevada podrá oscilar entre 5-7M.

(Vajta et al., 2014)

- Envasado del material a vitrificar en dispositivos apropiados
- Descenso ultrarrápido de la temperatura. Este paso se realiza generalmente exponiendo la muestra directamente al nitrógeno líquido.

(Vanderzwalmen et al., 2015)

El proceso de vitrificación inicia con la recolección de los embriones, al día 6, 6.5, ya que serán menores de 300mm de diámetro, son lavados y traspasados a un medio de sujeción (máximo 10 a 15 minutos), siempre en un ambiente con temperatura moderada (22-24°C), En el caso que se exponga al embrión a unas condiciones pobres, provoca a posteriori una reducción de la viabilidad del embrión. Seguidamente, las soluciones y los diluyentes que están en refrigeración se deben de poner a temperatura ambiente. (Canesin et al., 2018).

Para continuar el procedimiento, (Atares, 2020) menciona que, se deben de preparar cuatro grupos de diluyentes, como se observa en la tabla 1.

VS1: Solución tampón de 1.40 M Glicerol en fosfato

VS2: 1.40 M glicerol y 3.60 M Etilenglicol

VS3: 3.40 M glicerol y 4.60 M Etilenglicol

DS: 0.50 M Galactosa, para cuando se cargan las pajillas

**Tabla 2**

*Preparación de las soluciones de vitrificación y solución de dilución.*

Solución	Gly <sup>a</sup>	EG <sup>b</sup>	Gal <sup>c</sup>	mPBSd
VS1 (Gly [1.40 M])	1.00 mL	-		9.00 mL
VS2 (Gly [1.4 0M] + EG [3.60M])	1.00 mL	2.00 mL		7.00 mL
VS3 (Gly [3.40M] + EG [4.60 M])	2.40 mL	2.60 mL		5.00 mL
DS (galactosa [0.50 m])			0.90 g	10.00 mL

Abreviaciones: DS, solución dilución; EG, etilenglicol; Gal, galactosa; Gly, glicerol; mPBS, solución salina tamponada con fosfato modificado; VS, solución vitrificación.

<sup>a</sup> Glicerol

<sup>b</sup> Etilenglicol

<sup>c</sup> Galactosa

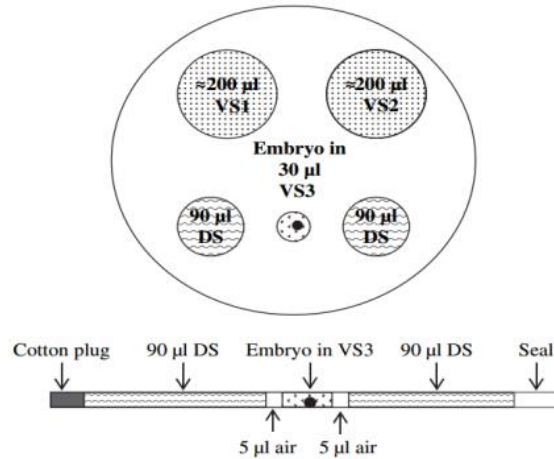
<sup>d</sup> solución salina tamponada con fosfato modificado (sin calcio ni magnesio y suplementado con piruvato de sodio [0.3 mmol] glucosa [3.3 mmol], y 20% suero fetal de ternero)

*Nota.* Análisis de la tasa de concepción de embriones vitrificados con el método tradicional y con la utilización de la micromanipulación. Tomada de Atares (2020)

Después de esto, este mismo autor, menciona que, el embrión es cambiado del medio a la solución VS1 durante 5 minutos, después pasa a VS2 durante otros 5 minutos, y por último se introduce en VS3 un minuto, se carga una pajilla de 250µL como se describe a continuación: se introduce primero 90 µL de diluyente, aire, 50 µL de VS3 con el embrión, 50 µL aire y 90 µL de diluyente, como se observa a continuación en la Figura 4.

### Figura 3

#### Preparación de la pajilla para vitrificación



*Nota.* Análisis de la tasa de concepción de embriones vitrificados con el método tradicional y con la utilización de la micromanipulación. Tomada de (Atares, 2020)

Finalmente, para realizar la vitrificación, se introduce la pajita en un vapor de nitrógeno durante un minuto, para evitar el shock térmico, y seguidamente se introduce dentro del nitrógeno líquido, siempre de manera vertical. Una vez vitrificado se cambia a un tanque de sujeción. (Atares, 2020)

#### **Descongelación Embriones Vitrificados**

La técnica anteriormente usada al momento de transferir el embrión se desvitrificaba sujetando la pajilla 10 segundos en el aire sin tocar el centro, y después introducirlo a 20° a baño maría durante otros 10 segundos, el contenido de la pajilla era agitado un par de veces para mezclar el diluyente con el crioprotector, y se mantiene horizontal 4-5 minutos. (Atares, 2020).

Otro método mencionado por la literatura para realizar la desvitrificación es mediante el cambio del embrión en diferentes concentraciones de sacarosa, el cual

empieza con la inmersión del embrión en un medio de mantenimiento suplementado con 0.3 M de sacarosa, seguido de 0.15 M, y finalmente 0 M durante 2 minutos cada uno, de tal forma que se obtenga una descongelación y rehidratación del embrión evitando el shock osmótico, (Canesin et al., 2018). Para finalizar el procedimiento, se deposita el embrión en la pajilla o se extrae el contenido de la pajilla de 0.25 ml, con una pistola de transferencia embrionaria, se equilibra y se introduce en la yegua receptora, previamente sincronizada. (Squires, 2016)

### ***Concentración y Tiempo de Exposición a los Crioprotectores***

La concentración necesaria para lograr una vitrificación termodinámicamente estable es muy alta, lo que provoca efectos osmóticos tóxicos, (Allahbadia et al, 2015). Para minimizar estos efectos se siguen dos enfoques: el primero es la reducción de temperatura y el tiempo de exposición a los crioprotectores, y el segundo es la reducción de la concentración de crioprotector mediante el uso de protocolos de vitrificación metaestable, en los que las velocidades de enfriamiento y calentamiento aumentan considerablemente, mediante el uso de un volumen mínimo, minimizar el volumen de la muestra, disminuye la cantidad de líquido que debe ser sometido a enfriamiento, aumentando así las tasas de enfriamiento y calentamiento, por lo que se reduce la probabilidad de la formación de cristales de hielo. (Ortiz, 2017)

### ***Micromanipulación del embrión***

La micromanipulación del embrión se realiza mediante la punción y la aspiración del líquido del blastocelo. De este modo, se realiza un colapso del embrión mediante el Piezo-drill que permite abrir un pequeño agujero en la cápsula para entrar con la pipeta en la cavidad blastocélica y así aspirar el líquido, provocando el colapso del embrión. De esta forma, se evita la producción de cristales que son contraproducentes para los ratios de supervivencia y de gestación. (Atares, 2020)

## **Factores que Influyen en la Vitrificación de Embriones**

### ***Calidad, Tamaño y Edad del Embrión***

El tamaño del embrión es el principal factor que afecta la supervivencia después de la criopreservación, cuando el embrión desciende al útero desde el oviducto mide entre 150 y 220mm, en forma de mórula o blastocisto temprano, en un lapso de 0.5 a 1.0 días el embrión aumentara su diámetro a >300mm, y se convertirá en un blastocisto; la mórula y el blastocisto temprano están rodeados por una gruesa zona pelúcida, sin embargo, para el día séptimo la zona pelúcida se ha adelgazado, y se ha formado la capsula de glicoproteína acelular subyacente, por lo tanto los embriones que miden más de 300mm no sobreviven a la congelación y descongelación debido a que la capsula y la gran cantidad de líquido del blastocelo impiden la penetración del crioprotector. (Squires y McCue, 2016)

### ***Toxicidad de los Crioprotectores***

El embrión equino posee características únicas que condicionan la concentración y tiempo de equilibrado con el crioprotector, en función de la etapa de desarrollo en la que se encuentre.

Según (Ortiz, 2017) los crioprotectores permeables pueden llegar a afectar directa o indirectamente las células, estos pueden causar, despolimerización, desorganización de microtúbulos y microfilamentos, lo que resulta en dispersión cromosómica, desarrollo de aneuploidía o citocinesis anormal, alteraciones en la integridad de la membrana, el metabolismo y el potencial de desarrollo del embrión, endurecimiento de la zona pelúcida, desestabilización de proteínas, y alteración intracelular del calcio de los ovocitos.

## **Métodos y técnicas de trabajo**

Se realizó una exhaustiva búsqueda sobre el tema seleccionado previamente, “Vitrificación y criopreservación de embriones en la especie equina”, utilizando motores de búsqueda confiables que ofrezcan información verídica y precisa para llevar a cabo esta revisión bibliográfica.

Las bases de datos seleccionadas para el desarrollo de esta investigación serán Science Direct, Elsevier, Google Academic, Wiley Online Library – Reproduction in Domestic Animals, Scopus, Journal Of Veterinary Clinic y PubMed.

Los criterios de inclusión para los artículos, investigaciones y estudios que se utilizaron en esta revisión bibliográfica serán aquellos que contengan información relevante sobre la vitrificación de embriones en equinos, historia, técnicas, metodologías, ventajas y desventajas, así como los últimos avances sobre el tema para asegurar la presentación de información actualizada, publicados con un máximo de 10 años, a la fecha (2024). Cualquier artículo que no cumpla con estos parámetros fue descartado para la realización de esta monografía.

La búsqueda de información se realizó principalmente en inglés, portugués y español. Los términos clave para la elaboración de la investigación son los siguientes: Vitrification, Equine, Embryos, Criopreservation.

## **Revisión sistemática y analítica**

El éxito de la vitrificación como método de criopreservación de los sistemas vivos y tejidos relacionados con funciones reproductivas en general es el resultado de un proceso de décadas de mejora gradual, de la comprensión de los requerimientos físicos y biológicos de la criopreservación. A pesar de muchos malentendidos básicos, falsos comienzos y fallos a lo largo del camino, la viabilidad intrínseca de la criopreservación por

vitrificación es ahora clara y las aplicaciones continúan creciendo de forma explosiva tres décadas después de que se lanzara la primera ola moderna de entusiasmo por la vitalización. Sigue estableciéndose una variedad de nuevos métodos para evitar las lesiones, aumentar la seguridad y mejorar la facilidad de uso, y esto puede esperarse que continúe. (Ceballos et al, 2018)

El éxito de la técnica depende el tamaño del embrión, el cual entra en el útero desde el oviducto cuando tiene un tamaño de 150 a 220  $\mu\text{m}$  y tiene la morfología de mórula o un blastocisto temprano. Se ha observado que el mayor factor que afecta a las ratios de gestación es el tamaño del embrión, los que son menores de 300  $\mu\text{m}$  tiene más probabilidad de sobrevivir, a diferencia de los de más de 300  $\mu\text{m}$  que tienen poca probabilidad de supervivencia (menos del 30% de tasas de gestación). Este suceso es provocado por la estructura del embrión, un embrión expandido incrementa el fluido de blastocele y la zona pelúcida se reduce hasta ser reemplazado por la cápsula acelular. (Hinrichs, 2018)

Dentro del proceso se producen errores los cuales pueden inferir en las bajas tasas de gestación, por lo tanto, hay que procurar cumplir los tiempos específicos de inmersión en cada medio o solución, ya que es allí donde el embrión corre más riesgos, otras dificultades que se pueden encontrar es la gran cantidad de crioprotectores a los cuales es sometido el embrión ya que estos son tóxicos, por esta razón existen protocolos específicos para llevar a cabo la técnica. (Atares, 2020)

Según lo afirma (Hendriks et al., 2014) los embriones vitrificados de mayor tamaño obtendrían un porcentaje elevado de células muertas, afectando la distribución mitocondrial, lo que provoca una distribución granulomatosa heterogénea, a diferencia de la congelación lenta obteniendo un menor porcentaje de daño celular. La técnica de vitrificación se considera diferente a la congelación lenta ya que elimina totalmente los

daños mecánicos producidos por la formación de cristales, es más rápida, simple y más económica.

La micromanipulación del embrión previa a la vitrificación ha demostrado ser muy eficaz frente al incremento de las tasas de concepción, mejorando la supervivencia del embrión debido a la extracción del líquido del blastocele, evitando así la formación de cristales al criopreservar dado que la cápsula embrionaria impide la eficiente penetración del crioprotector. (Díaz et al., 2015)

(Díaz, 2015) determinó que el ratio de gestación en embriones extraídos al día 8, vitrificados con previa micromanipulación fue del 83.3% con un resultado estadísticamente significativo, finalmente (Hinrich y Ho Choi, 2016) en un estudio más reciente determinaron que el ratio de gestación, para los embriones mayores de 550  $\mu\text{m}$  que se les realizó la micromanipulación para la vitrificación, fue del 72%, De todos modos, concluyeron que la micromanipulación no era una requisito para el éxito de la técnica si el diámetro del embrión era inferior a 550  $\mu\text{m}$ , pero su utilización se debe a la necesidad de evitar la formación de cristales, dado que los crioprotectores no tienen la capacidad de traspasar la capsula embrionaria equina.

### **Conclusiones y Recomendaciones**

Múltiples factores pueden ser tomados en consideración para establecer programas de vitrificación exitosos. En yeguas una determinación exacta de la ovulación es crítica ya que esto permite la recuperación de embriones con el tamaño esperado. (Urias y Boeta, 2022). Por otro lado, es importante comprender en su totalidad la fisiología reproductiva de la yegua resulta completamente indispensable para el profesional que reconozca los tiempos exactos y adecuados para hacer uso de las diferentes biotecnologías reproductivas.

Así como conocer la fisiología reproductiva es indispensable, el reconocimiento de cada una de las biotecnologías reproductivas disponibles es necesario como complemento, donde esto permita reconocer las ventajas y desventajas de cada biotecnología, cuál tiene una mayor aptitud para cada yegua como individuo único.

La vitrificación de embriones ha sido reconocida en la actualidad y en el gremio de la reproducción equina debido a su alta eficiencia, en comparación a otras biotecnologías reproductivas como la congelación lenta, además de ser una técnica segura para los embriones por una notable reducción en los efectos mecánicos en estos.

La revisión sistemática y analítica de información enfocada puede generar un gran aporte al futuro Médico Veterinario, permitiendo conocer diferentes técnicas orientadas a las diferentes áreas como reproducción, fisiología, producción, entre otras, ampliando su conocimiento y llevar esto a la práctica del día a día.

## Bibliografía

- Allahbadia, G., Kuwayama, M. y Gandhi, G. (2015). *Vitrification in assisted reproduction, a user's manual*. Springer. DOI 10.1007/978-81-322-1527-1
- Atares, E. (2020). *Análisis de la tasa de concepción de embriones vitrificados con el método tradicional y con la utilización de la micromanipulación*. [Trabajo final de grado en Ciencia y Producción, Universitat de Lleida]. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària. <https://repositori.udl.cat/server/api/core/bitstreams/70eff5e2-6641-423c-87e3-f2496e6dab77/content>
- Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado L., Gómez, C., Lozano, J. (2006). *Fundamentos de criopreservación*. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología. 57(4).  
<http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v57n4/v57n4a08.pdf>
- Canesin, H., Salgado, R., Ortiz, I., Brom-de-Luna, J., Rocha, A. y Hinrichs, K. (2018). *Effect of Warming Method in a Simplified Equine Embryo Vitrification System*. Journal of Equine Veterinary Science, 66.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.03.012>
- Cassa Salas, A. (2018). *Vitrificación y calidad de embriones de alpaca (vicugna pacos) recuperados por superovulación utilizando la hormona gonadotropina coriónica equina (ecg)*. [Tesis de grado para optar el título profesional de médico veterinario y zootecnista, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac].  
[https://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/632/T\\_0355.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unamba.edu.pe/bitstream/handle/UNAMBA/632/T_0355.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Ceballos, J., Echeverri, E. y Zuluaga, R. (2018). La vitrificación como alternativa para la criopreservación de oocitos y embriones equinos y bovinos

- Choi, Y. y Hinrichs, K. (2016). Vitrification of in vitro-produced and in vivo-recovered equine blastocysts in a clinical program. *Theriogenology*, 1;87:48-54.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.08.005>
- Cortés, Z., Aréchiga, C., Rincón, M., Ronchín, F., López, M. y Flores, G. (2018). *Mare reproductive cycle: a Review*. *Abanico Veterinario*. 8(3): 14-41.  
<https://doi.org/10.21929/abavet2018.83.1>
- Díaz, F., Bondioli, K., Paccamonti, D., Gentry, G.T. (2015) *Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification*. *Theriogenology*, 15;85(5):894-903.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.039>
- Hendriks, W., Colenbrader, B., Roelen, B. y Stout, T. (2014). *Cellular damage suffered by equine embryos after exposure to cryoprotectants by slow-freezing or vitrification*. *Equine Veterinary Journal*, 47(6):701-707. <https://doi.org/10.1111/evj.12341>
- Hinrichs, K. (2018). *Assisted reproductive techniques in mares*. *Reproduction in domestic animals*, 53(2):4-13. <https://doi.org/10.1111/rda.13259>
- Izquierdo, A., Liera, J., Mancera, A., Perez, J., Arroyo, G. y Mosaqueda, M. (2015). *Congelación de embriones bovinos*. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 9(2): 22 – 40 ISSN 1988-2688
- Marenzi, M. (2015). *Aspectos operativos en transferencia embrionaria equina y análisis del potencial de la tecnología de criopreservación*. [Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Universidad Católica Argentina.]  
<https://repositorio.uca.edu.ar/bitstream/123456789/432/1/doc.pdf>

- Ortiz, N. (2017). *Vitrification of oocytes and embryos in cattle and horses: as clear as a glass?* Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health. Faculty of Veterinary Medicine. Ghent University
- Pegg, D. (2015). *Principles of Cryopreservation*. En Wolkers y Oldenhof, Cryopreservation and Freeze - Drying Protocols (3 - 19). New York: Humana Press.
- Phillips, P. y Jahnke, M. (2016). *Embryo Transfer (Techniques, donors, and recipients)*. The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 32(2): 365 -385.
- Rusciano, G., Canditiis, C., Zito, G., Rubessa, M., Roca, M., Carotenuto, R., Sasso, A. y Gasparrini, B. (2017). *Raman-microscopy investigation of vitrification - induced structural damages in mature bovine oocytes*. PLoS ONE, 12(5).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177677>
- Scofield, D. (2015). *Cryopreservation of Equine Embryos. Mare Management, Embryo Transfer*. Select Breeders Services
- Squires, E. (2016). *Breakthroughs in Equine Embryo Cryopreservation*. The Veterinary clinics of North America: Equine practice. 32(3): 415 – 424
- Squires, E. y McCue, P. (2016). *Cryopreservation of Equine Embryos*. Journal of Equine Veterinary Science 41:7-12. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.03.009>
- Umair, M., Beitsma, M., de Ruijter-Villani, M., Deelen, C., Herrera, C., Stout, T., y Claes, A. (2023). *Vitrifying expanded equine embryos collapsed by blastocoel aspiration is less damaging than slow-freezing*. Theriogenology. 202: 28–35.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.02.028>

Urias, C. y Boeta, M. (2022). *Collection, vitrification and post-warming transfer of equine embryos produced in vivo: a literature review*. *Abanico Veterinario*. 12:1-21.

<http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.18>

Vajta, G., Reichart, A., Filippo, U. y Rienzi, L. (2014). *From a backup technology to a strategy-outlining approach: the success story of cryopreservation*. *Expert Review of 43 Obstetrics & Gynecology*. 8(2): 181 – 190

Vanderzwalmen, P., Zech, N., Ectors, F., Panagiotidis, Y., Papatheodorou, A., Yannis, P. y Wirleitner, B. (2015). *Vitrification of oocytes and embryos: Finally, a recognized technique, but still a source of concern and debate*. En Tucker y Liebermann, *Vitrification in Assisted Reproduction* (23 - 34). Boca Raton: CRC Press.

Vizuete, G. (2016). *Implementación de la Vitrificación Embrionaria en Razas Equinas como Herramienta para su Conservación y Progreso*. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Universidad de Córdoba.

<https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/13666/2016000001442.pdf?sequence=3>

Xueli, Y., Yakun, X., Wu, H., Xian, G., Xiao, L., Wen, H. y Li, YH. (2015). *Successful vitrification of bovine immature oocyte using liquid helium instead of liquid nitrogen as cryogenic liquid*. *Theriogenology*. 85(6): 1090 – 1096.

<http://doi.org.10.1016/j.theriogenology.2015.11.020>