



Efecto del protocolo de vitrificación y sistemas de empaque sobre la tasa de supervivencia de embriones ovinos obtenidos in vivo

Daniel Fernando González Mendoza

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Programas de Posgrados
Bogotá D. C. Colombia

2020

Efecto del protocolo de vitrificación y sistemas de empaque sobre la tasa de supervivencia de embriones ovinos obtenidos in vivo

Daniel Fernando González Mendoza

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Salud Animal

Directora:

Claudia Jiménez Escobar

DVM, MSC, DVSC, DACT

Codirector:

Jorge Zambrano

DVM, MPVM. PhD. Dipl ACT

Línea de Investigación:

Reproducción Animal y Salud De Hato

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Facultad de Medicina Veterinaria Y de Zootecnia

Programas de Posgrados

Bogotá D. C. Colombia

2020

Dedicado A

Mis padres

Segundo Rafael y María Inés

A quienes les debo todo

En especial a mi madre

Que siempre vivirá en mi corazón

Mis Hermanos Diego; Leonardo y Yuli Carolina

Por su ayuda y apoyo permanente

Mi hija Sara Daniela

La razón de mi vida

Mi Novia Erika Eliana

Por ser Incondicional y mi gran Amor

Agradecimientos

El autor expresa su más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han colaborado en la realización y culminación de este trabajo de investigación. Fundación Universitaria Juan de Castellanos, Gobernación de Boyacá, Colciencias, Universidad Nacional de Colombia Programas de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.

En especial agradezco infinitamente a La Doctora Claudia Jiménez Escobar MV MSc DVSc DACT docente titular Universidad Nacional de Colombia por su comprensión, amabilidad, apoyo, soporte científico, paciencia y sobre todo ser una gran persona digna de admiración y respeto.

A mi Codirector Doctor Jorge Zambrano V. DVM. MPVM. PhD. DACT docente Universidad Nacional de Colombia y todos miembros del Grupo de Investigación en Reproducción Animal y Salud de Hato de la Universidad Nacional de Colombia Doctores Humberto Guaqueta MV PhD y Harvey Lozano MV Esp MSc PhD Profesor Asociado, Universidad Nacional de Colombia. Mis Docentes Carlos Manrique Perdomo MSc PhD y Olimpo Oliver Espinosa MV Esp MSc PhD; y personal Posgrados Facultad Medicina Veterinaria Zootecnia Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

Al Padre Luis Enrique Pérez Ojeda Rector y Padre Oswaldo Martínez PhD. Vicerrector Académico, a la Doctora María del Carmen Rodríguez de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos por su apoyo incondicional y colaboración con lograr este objetivo.

A la Doctora Ruth Maribel Forero Biol MSc. PhD Coordinadora Programa Doctorado en Ciencias Biológicas y Ambientales, Doctora Ana Cruz Morillo Coronado Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) Tunja por su colaboración en préstamo laboratorio y equipos para culminación fase trabajo investigación.

A mis amigos colegas y grandes compañeros Elkin Gustavo Forero Becerra, Carlos Andrés Vega y Héctor Cortez por motivarme y alentarme a realizar este sueño en el mejor lugar posible la Universidad Nacional de Colombia.

A mis estudiantes Jesikka Lucia Becerra y Karol Ginneth Monroy; a mis compañeros, en especial Yohana López y Juanita Andrade por su colaboración, apoyo en este trabajo de investigación, finalmente a mis amigos y familiares. Por su apoyo y paciencia para conmigo.

Resumen

La presente investigación tuvo como fin evaluar metodologías que facilitarían el proceso de vitrificación de embriones ovinos y la eliminación de potenciales contaminantes, comparando dos sistemas de empaque (abierto y cerrado) ya que el uso de empaques abiertos se consideran un riesgo de bioseguridad en este tipo de biotecnología reproductiva. Para este fin, se seleccionaron 25 ovejas trihíbridas adultas en buenas condiciones sanitarias y nutricionales, cruces de razas Katahdin, Pelibuey y Dorset entre el primero y sexto parto. Se sincronizaron un grupo de cinco ovejas, cada 7 días durante cinco semanas mediante esponjas vaginales impregnadas con 60mg de Acetato Medroxiprogesterona por 13 días; además, se realizó un tratamiento de superovulación entre el día 11 al 14 de tratamiento con 160mg de Hormona Folículo Estimulante porcina (pFSH) en ocho dosis decrecientes, cada 12h paralelamente con la remoción del dispositivo vaginal en el día 13. Por otro lado, se realizó detección de celo con un macho vasectomizado y monta natural controlada, al día siete de esta se realizó recolección de embriones por medio de laparotomía. Subsiguientemente se evaluaron y clasificaron los embriones de acuerdo con las pautas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones, y se procedió a realizar criopreservación de sólo embriones categorizados como buenos y excelentes. Se obtuvieron 222 embriones de los cuales se criopreservaron 220, tomando un primer grupo (n=110, 50%) que se vitrificó mediante empaque Abierto (open-pulled Straw, OPS) y el segundo tratamiento experimental (n=110, 50%) se vitrificó a través del método cerrado con pajillas de 0.25cc. Ambos tratamientos divididos equitativamente por etapa de desarrollo y tipo de empaque. Se desvitrificaron 160 embriones, de los 220 congelados, ochenta por cada método de vitrificación los cuales fueron cultivados en una incubadora con 5% de CO₂ en aire a 39° C por 72 horas, determinando el porcentaje de embriones reexpandidos a 24, 48 y 72 horas post desvitrificación y su tasa de eclosión, obteniendo una viabilidad del 72,6% (n= 80) para los embriones vitrificados por OPS y del 67,6% (n=80) para los embriones vitrificados por pajilla. Posteriormente se compararon las tasas de supervivencia embrionaria con la prueba de chi-cuadrado con un p-valor 0,49, concluyendo que no existe dependencia o asociación entre la variable (supervivencia) y el factor (empaque); las diferencias significativas se tomaron con un p<0,05. Finalmente, con este estudio se logró aplicar con éxito biotecnologías reproductivas como la ultrasonografía, laparoscopia, sincronización, superovulación, transferencia de embriones y criopreservación de embriones por medio de la vitrificación con dos sistemas de empaque en ovejas trihíbridas bajo nuestras condiciones ambientales y de manejo. Considerando que el empaque cerrado es mejor en términos de bioseguridad y que no hubo diferencias con el sistema OPS, se recomienda trabajar el sistema cerrado para vitrificar embriones ovinos.

Palabras clave: Criopreservación, Ovejas, Vitrificación, Pajilla Abierta (OPS), Pajilla 0,25.

Abstract

The purpose of this research was to evaluate two different packaging systems to cryopreserve ovine embryos avoiding potential contaminants in vitrification processes related to the use of open packages such as the open-pulled straw system, which is considered to be unsuitable for use in commercial embryo cryopreservation. For this purpose, 25 adult trihybrid ewes (crosses of Katahdin, Pelibuey and Dorset) in good sanitary and nutritional conditions were selected between the first and sixth lambing. Groups of five ewes were synchronized every 7 days for five weeks with intravaginal pessaries impregnated with 60mg of Medroxyprogesterone Acetate for 13 days. In addition, a superovulation treatment was performed between the 11th and 14th day of treatment with 160mg of porcine Follicle-Stimulating Hormone (pFSH) in eight decreasing doses every 12h. Controlled natural breeding was performed after estrus detection with a vasectomized male; seven days after natural breeding, embryo collection was performed by means of laparotomy. Subsequently, the embryos were evaluated and classified according to the guidelines of the International Embryo Transfer Society and only embryos categorized as excellent and good were used in cryopreservation treatments. From the 222 embryos obtained, 220 were cryopreserved; embryos were divided in two treatment groups: first group (n=110, 50%) which were vitrified in open-pulled straws (OPS) and the second group (n=110, 50%) were vitrified in 0.25cc straws. Both treatments were equally divided by developmental stage and type of packaging. For survival evaluation, 160 of the 220 embryos were devitrified, eighty by each method of packaging. These were immediately cultured in an incubator with 5% CO₂ in air at 39° C for 72 hours, determining a percentage of embryos re-expanded at 24, 48 and 72 hours post-devitrification and the hatching rate. A viability of 72.6% (n=80) for the embryos vitrified by OPS and 67.6% (n=80) for the embryos vitrified by straw were obtained. Embryo survival rates were not significantly different among the two packaging methods (chi-square test) with a p-value of 0.49. Finally, with this study, reproductive biotechnologies such as ultrasonography, laparoscopy, synchronization, superovulation, embryo transfer, and cryopreservation of embryos through vitrification with two packing systems were successfully applied in trihybrid ewes. Considering that a closed packaging system is safer in terms of biosecurity and that there were no significant differences in survival rates compared to the OPS system, we recommend to freeze sheep embryos with closed techniques such as the use of 0.25 cc straws.

Keywords: Cryopreservation, Sheep, Ultra-Fast Freezing, Open Straw (OPS), Straw 0,25 cc.

Contenido	Pág.
Introducción	2
1. Revisión de literatura criopreservación embriones ovinos	5
1.1 Criopreservación	5
1.2 Crioprotectores.....	5
1.3 Etapas de la criopreservación.....	5
1.4 Métodos de criopreservación de embriones.....	6
1.4.1 Metodología convencional.....	6
1.4.2 Método de vitrificación.....	6
1.5 Efectos en las estructuras celulares por proceso criopreservación.....	8
1.6 Comparación entre la congelación convencional y la vitrificación	10
1.7 Factores que intervienen en el éxito de procesos de criopreservación	11
1.8 Diferentes crioprotectores y métodos de criopreservación	12
1.9 Dispositivos utilizados en la vitrificación	15
1.9.1 Los dispositivos de superficie.....	15
1.9.2 Los dispositivos de tubo	16
1.9.3 Empaques abiertos y cerrados en la vitrificación	16
1.9.4 Viabilidad estudios en Vitrificación pajillas 0,25 CC:	17
2. Objetivos	20
2.1 Objetivo general	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. Materiales y Metodos	21
3.1 Ubicación experimental, animales y diseño.	21
3.2 Tratamientos de sincronización y superovulación.....	22
3.3 Evaluación respuesta tratamiento superovulatorio	24
3.3.1 Evaluación por medio Ultrasonografía	24
3.3.2 Evaluación por medio de Laparoscopia:.....	25
3.3.3 Evaluación por medio de Laparotomía:	26
3.4 Recolección de embriones.....	27
3.5 Determinación de cantidad y calidad embrionaria	29
3.6 Criopreservación de embriones:.....	31
3.6.1 Tratamiento Método OPS (open-pulled straw):	32
3.6.2 Tratamiento Método Pajilla 0,25 CC:	34
3.7 Calentamiento Embriones.....	34
3.7.1 Tratamiento Método OPS (open-pulled straw):	34
3.7.2 Tratamiento Método Pajilla 0,25 cc:.....	35
3.8 Evaluación viabilidad tratamientos vitrificación	36
3.8.1 Evaluación viabilidad tratamientos vitrificación <i>in vitro</i>	36
3.8.2 Evaluación viabilidad tratamientos vitrificación <i>in vivo</i>	37
3.9 Análisis Datos.....	39
3.9.1 Análisis de datos Respuesta tratamientos superovulación	39
3.10 Resultados.....	40
3.10.1 Características de la muestra.....	40
3.10.2 Conteo de cuerpos lúteos	42
3.10.3 Análisis de Varianza entre las diferentes técnicas de conteo de cuerpos lúteos.....	43

3.10.4	Concordancia entre las técnicas de ultrasonografía y laparotomía para el conteo de cuerpos lúteos	44
3.10.5	Concordancia entre las técnicas de laparoscopia y laparotomía para el conteo de cuerpos lúteos	45
3.10.6	Cantidad de embriones recuperados	47
3.10.7	Relación entre el número de partos y el número de embriones recuperados	49
3.10.8	Relación entre la condición corporal y el número de embriones recuperados	50
3.10.9	Calidad embrionaria	53
3.10.10	Comparación de viabilidad embrionaria de dos sistemas de empaque para vitrificación.....	55
3.10.11	Viabilidad posterior tratamiento de vitrificación cerrada (pajilla) y abierta (OPS).....	57
3.10.12	Evaluación de viabilidad <i>in vivo</i>	58
3.11	Discusión	58
3.11.1	Uso ultrasonografía transrectal y laparoscopia con la laparotomía, en el diagnóstico de la respuesta superovulatoria a nivel de ovarios en ovejas superovuladas	58
3.11.2	Respuesta superovulatoria, tasa de recuperación, grado de desarrollo embrionario y calidad de embriones ovinos obtenidos <i>in vivo</i>	63
3.11.3	Efecto de la vitrificación y el sistema de empaque (abierto y cerrado) sobre la tasa de supervivencia de embriones ovinos obtenidos <i>in vivo</i>	72
3.11.4	Supervivencia a los procesos de vitrificación y empaque, de acuerdo a la tasa de preñez, de embriones ovinos producidos <i>in vivo</i>	74
4.	Conclusiones y recomendaciones	78
4.1	Conclusiones.....	78
4.2	Recomendaciones	79

Bibliografía

Anexos

Lista de figuras

	Pág.
FIGURA 1. PROCESO VITRIFICACIÓN.	7
FIGURA 2. CURVAS CONGELACIÓN CONVENCIONAL Y VITRIFICACIÓN	10
FIGURA 3. HEMBRAS TRIHÍBRIDAS DONADORAS PROYECTO OVINO FUJDC A PRIMÍPARAS, B MULTÍPARAS.....	21
FIGURA 4. MACHOS MONTAS NATURAL	22
FIGURA 5. DIAGRAMA PROCESOS OBTENCIÓN EMBRIONES, VITRIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE TRATAMIENTOS.....	23
FIGURA 6. PROCESO REALIZACIÓN ECOGRAFÍA TRANSRECTAL OVEJAS; A, BRETE CONTENCIÓN; B, SUJECIÓN; C, EVACUACIÓN RECTAL Y LUBRICACIÓN; D, ULTRASONOGRAFÍA.....	24
FIGURA 7. ULTRASONOGRAFÍAS DIFERENTES RESPUESTAS TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS; A, BAJA; B, MODERADA; C Y D ALTA.....	25
FIGURA 8. PROCESO QUIRÚRGICO; A, ANESTESIA ISOFLURANO; B, LAPAROTOMÍA RECUPERACIÓN DE EMBRIONES	26
FIGURA 9. EVALUACIÓN LAPAROSCÓPICA TRATAMIENTOS SUPEROVULACIÓN; A, RESPUESTA BAJA (OBSERVAN POCOS CL); B, RESPUESTA ALTA (SE OBSERVAN MUCHOS CL).....	26
FIGURA 10. EVALUACIÓN RESPUESTA SUPEROVULARÍA LAPAROTOMÍA (CONTROL); A, RESPUESTA BAJA B RESPUESTA MEDIA; C, RESPUESTA ALTA.....	27
FIGURA 11. OVEJA PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO A OVEJA CAMILLA QUIRÚRGICA CON TRAQUEO TUBO B ANESTESIA GENERAL RECUPERACIÓN EMBRIONES	28
FIGURA 12. PROCESO RECUPERACIÓN EMBRIONES. EQUIPO LAVADO A SONDAS Y FILTROS LAVADO B COLOCACIÓN SONDA CUERNO UTERINO, C COLOCACIÓN CATÉTER LUZ CUERNO UTERINO D LAVADO EMBRIONES.....	29
FIGURA 13. LAVADO UTERINO RECUPERACIÓN EMBRIONES; A , APLICACIÓN PBS; B , MASAJE UTERINO	29
FIGURA 14. BÚSQUEDA CLASIFICACIÓN Y EVALUACIÓN CALIDAD EMBRIONARIA	30
FIGURA 15. EMBRIONES OBTENIDOS DONADORAS TRIHIBRIDAS DE EXCELENTE Y BUENA CALIDAD.....	30
FIGURA 16. EVALUACIÓN CALIDAD EMBRIONARIA EMBRIONES; A CALIDAD EXCELENTE; B , CALIDAD BUENA.....	31
FIGURA 17. EMPAQUES TRATAMIENTOS VITRIFICACIÓN; A, OPS B PAJILLA 0,25 cc).	32
FIGURA 18. INSUMOS Y MATERIALES VITRIFICACIÓN Y DESVITRIFICACIÓN; A , PLACAS DE PETRI; B , CRIO PROTECTORES; C , MEDIOS SOLUCIONES; D , EMPAQUES OPS PAJILLAS 0,25CC Y CONTENEDORES).....	32
FIGURA 19. ESQUEMATIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS VITRIFICACIÓN CON SOLUCIÓN EQUILIBRIO (SE) SOLUCIÓN VITRIFICACIÓN 1 (SV1) Y SOLUCIÓN VITRIFICACIÓN 2 (SV2).....	33
FIGURA 20. PROCEDIMIENTO PARA REALIZACIÓN DE TÉCNICA VITRIFICACIÓN CON OPS Y PAJILLA 0,25 CC.....	33
FIGURA 21. MÉTODO CERRADO UN PASO VITRIFICACIÓN PAJILLA 0,25 CC. SE: SOLUCIÓN EQUILIBRIO, SDV1: SOLUCIÓN DE VITRIFICACIÓN 1 SC1: SOLUCIÓN CALENTAMIENTO 1, SC2: SOLUCIÓN CALENTAMIENTO 2 SH: SOLUCIÓN HOLDING.....	34
FIGURA 22. ESQUEMATIZACIÓN DE LOS PROTOCOLOS CALENTAMIENTO SOLUCIÓN CALENTAMIENTO (SC) SOLUCIÓN CALENTAMIENTO1 (SC1) SOLUCIÓN CALENTAMIENTO 2 (SC2).	35
FIGURA 23. LABORATORIO GENÉTICA HUMANA UPTC & EQUIPOS CULTIVO EMBRIONES DESVITRIFICADOS PARA EVALUACIÓN VIABILIDAD.	36
FIGURA 24. EVALUACIÓN IN VITRO EMBRIONES DESVITRIFICADOS; A , EMBRIONES DESARROLLO 24 HORAS OPS; B , EMBRIONES DESARROLLO 24 HORAS EN PAJILLA. C DESARROLLO CULTIVO CRECIMIENTO EMBRIONARIO 48 HORAS OPS. D DESARROLLO CULTIVO CRECIMIENTO EMBRIONARIO 48 HORAS PAJILLA E EMBRIÓN ECLOSIONADO. F EMBRIÓN MUERTO.	37

FIGURA 25. RECEPTORAS TRANSFERENCIA EMBRIONES CALENTADOS DE LA FUJDC	37
FIGURA 26. TRANSFERENCIA EMBRIONES CALENTADOS A RECEPTORAS.	38
FIGURA 27. DIAGNOSTICO PREÑEZ ULTRASONOGRAFÍA A PLACENTOMAS B FETO. PS CERRADO (PAJILLA).	38
FIGURA 28. RECEPTORAS CRÍAS EMBRIONES VITRIFICADOS OPS A Y B. PAJILLA 0,25CC C.	38
FIGURA 29. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LA MUESTRA ANALIZADA SEGÚN LA CONDICIÓN CORPORAL DE LOS ANIMALES.	41
FIGURA 30. HISTOGRAMA DE DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIA ABSOLUTA PARA EL PESO EN KG DE LAS OVEJAS EN LA MUESTRA ANALIZADA	41
FIGURA 31. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LAS HEMBRAS EN LA MUESTRA SEGÚN EL NÚMERO DE PARTOS PRESENTADOS AL MOMENTO DEL TRATAMIENTO.	42
FIGURA 32. GRÁFICO DE DISPERSIÓN QUE MUESTRA LA RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CUERPOS LÚTEOS DETECTADOS POR ULTRASONOGRAFÍA Y LAPAROTOMÍA EN EL OVARIO DERECHO DE LAS OVEJAS EN LA MUESTRA.....	44
FIGURA 33. GRÁFICO DE DISPERSIÓN QUE MUESTRA LA RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CUERPOS LÚTEOS DETECTADOS POR ULTRASONOGRAFÍA Y LAPAROTOMÍA EN EL OVARIO IZQUIERDO DE LAS OVEJAS EN LA MUESTRA.	45
FIGURA 34. GRÁFICO DE DISPERSIÓN QUE MUESTRA LA RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CUERPOS LÚTEOS DETECTADOS POR LAPAROSCOPIA Y LAPAROTOMÍA EN EL OVARIO DERECHO DE LAS OVEJAS EN LA MUESTRA. RHO DE SPEARMAN=0,93677, W DE KENDALL= 0,9684.....	45
FIGURA 35. GRÁFICO DE DISPERSIÓN QUE MUESTRA LA RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CUERPOS LÚTEOS DETECTADOS POR LAPAROSCOPIA Y LAPAROTOMÍA EN EL OVARIO IZQUIERDO DE LAS OVEJAS EN LA MUESTRA. RHO DE SPEARMAN=0,86225, W DE KENDALL=0,9311.....	46
FIGURA 36. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LOS EMBRIONES RECUPERADOS SEGUN NUMERO DE PARTOS	47
FIGURA 37. TASA RECUPERACIÓN EMBRIONES SEGÚN NÚMERO DE PARTOS.	48
FIGURA 38. CONDICIONES CORPORALES Y NÚMERO DE EMBRIONES RECUPERADOS	49
FIGURA 39. TASA RECUPERACIÓN EMBRIONES SEGÚN CONDICIONES CORPORALES.	49
FIGURA 40. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LOS 222 EMBRIONES RECUPERADOS SEGÚN EL ESTADIO DE DESARROLLO ALCANZADO.	51
FIGURA 41. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LOS EMBRIONES RECUPERADOS SEGÚN EL ESTADIO DE DESARROLLO ALCANZADO Y NÚMERO DE PARTOS.	52
FIGURA 42. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LOS EMBRIONES RECUPERADOS SEGÚN EL ESTADIO DE DESARROLLO ALCANZADO Y CONDICIÓN CORPORAL.	52
FIGURA 43. NÚMERO DE PARTOS CALIDAD EMBRIONES RECUPERADOS.	54
FIGURA 44. CONDICIÓN CORPORAL CALIDAD EMBRIONES RECUPERADOS.....	55
FIGURA 45. PORCENTAJE VIABILIDAD TRATAMIENTOS VITRIFICACIÓN ABIERTO (OPS) Y CERRADO (PAJILLA) A LAS 72 HORAS	56
FIGURA 46. ESTADIOS DE DESARROLLO EVALUACIÓN RE-EXPANSIÓN ECLOSIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EMBRIONES VITRIFICACIÓN ABIERTO (OPS) Y CERRADO (PAJILLA) A LAS 24, 48 Y 72 HORAS.	56
FIGURA 47. PORCENTAJE PREÑEZ EMBRIONES TRANSFERIDOS TRATAMIENTOS VITRIFICACIÓN ABIERTO	58

Lista de tablas

Pág.

TABLA 1. COMPARACIÓN DE VITRIFICACIÓN Y CONGELACIÓN CONVENCIONAL DE EMBRIONES. 8

TABLA 2. PRINCIPALES EFECTOS DEL PROCESO CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LAS ESTRUCTURAS CELULARES. 9

TABLA 3. REEXPANSIÓN TASAS DE EMBRIONES OVINOS CRIOPRESERVADOS POR CONGELACIÓN CONVENCIONAL Y VITRIFICACIÓN. 12

TABLA 4. REEXPANSIÓN Y TASAS DE ECLOSIÓN DE EMBRIONES OVINOS CRIOPRESERVADOS POR LA CONGELACIÓN CONVENCIONAL CON ETILENGLICOL Y VITRIFICACIÓN EN OPS CON ETILENGLICOL Y DIMETILFORMAMIDA. 13

TABLA 5. DAÑOS OCASIONADOS PROCESOS VITRIFICACIÓN Y CONGELACIÓN CONVENCIONAL EMBRIONES OVINOS. 14

TABLA 6. DIFERENTES PORCENTAJES PREÑEZ Y DE CORDEROS NACIDOS DE EMBRIONES OVINOS CRIOPRESERVADOS. 15

TABLA 7. NÚMERO DE CUERPOS LÚTEOS DETECTADOS MEDIANTE DIFERENTES TÉCNICAS EN OVEJAS SOMETIDAS A TRATAMIENTO DE SUPEROVULACIÓN. 43

TABLA 8. CONCORDANCIA ENTRE LAS TÉCNICAS DE ULTRASONOGRAFÍA, LAPAROSCOPIA Y LAPAROTOMÍA PARA EL CONTEO DE CUERPOS LÚTEOS. 46

TABLA 9. TASA DE RECUPERACIÓN DE EMBRIONES DE ACUERDO A NÚMERO DE PARTOS. 48

TABLA 10. TASA DE RECUPERACIÓN DE EMBRIONES DE ACUERDO CON LA CONDICIÓN CORPORAL. 50

TABLA 11. ESTADIOS DE DESARROLLO RECUPERADOS DE ACUERDO NÚMERO DE PARTOS. 51

TABLA 12. ESTADIOS DE DESARROLLO RECUPERADOS DE ACUERDO A LA CONDICIÓN CORPORAL. 52

TABLA 13. CANTIDAD TOTAL Y PORCENTAJE (%) DE EMBRIONES RECOLECTADOS SEGÚN GRADOS DE CALIDAD Y NÚMERO DE PARTOS. 53

TABLA 14. CANTIDAD TOTAL Y PORCENTAJE DE EMBRIONES RECOLECTADOS GRADOS DE CALIDAD Y LA CONDICIÓN CORPORAL. ... 54

TABLA 15. CALIDAD EMBRIONARIA VS NÚMERO DE PARTOS Y CONDICIÓN CORPORAL. 55

TABLA 16. ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE EMPAQUES ABIERTO Y CERRADO ANALIZANDO PORCENTAJES DE ESTADIOS DESARROLLO IN VITRO. 57

TABLA 17. RESULTADO PRUEBA CHI CUADRADO TRATAMIENTO VITRIFICACIÓN EMPAQUE ABIERTO (OPS) Y CERRADO (PAJILLA) A LAS 72 HORAS. 57

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ART	Tecnologías reproductivas asistidas
CPA	Agente crioprotector
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
eCG	Gonadotropina coriónica equina
EG	Etilenglicol
EHM	Medio de manejo de embriones
EN	Envoltura nuclear
ES	Solución de equilibrio
FCS	Suero de ternera fetal
FSH	Hormona estimuladora folicular
Gro	Glicerol
HM	Holding Medium
IETS	Sociedad internacional transferencia de embriones
IVM	Cultivo <i>in vitro</i>
IVM	Maduración <i>in vitro</i>
MOET	Ovulación múltiple y transferencia de embriones.
NEAA	Aminoácidos no esenciales
OPS	(open-pulled Straw) Pajilla abierta
PBS	Solución buffer de fosforado salino
pFSH	Hormona folículo estimulante
pLH	Hormona luteinizante
PVA	Alcohol de polivinilo
SC1	Solución de calentamiento 1
SC2	Solución de calentamiento 2
SE	Solución de Equilibrio
SOF	Fluido Oviductal Sintético
SSS	Sustituto de Suero Sintético
SV	Solución de vitrificación
SV1	Solución de vitrificación 1
SV2	Solución de vitrificación 2
TS	Dos pasos
ZP	Zona pelúcida

Introducción

La criopreservación de embriones en rumiantes se ha desarrollado considerablemente a nivel mundial en los últimos años, permitiendo un aumento significativo de su utilización a nivel práctico. De acuerdo con los reportes de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) (Stringfellow & Givens, 2010), en Europa, de 20.497 lavados uterinos en el 2015 se obtuvieron 127.980 embriones transferibles, el 41.7 % se utilizaron en fresco y el restante 58.3 % posterior a la congelación y descongelación. Según datos de la IETS los ovinos son la tercera especie con más producción después de los bovinos y los equinos, en el 2018, se produjeron 18.400 embriones ovinos convirtiéndose Suramérica en el mayor productor y Brasil el país con mayor producción, con respecto a las exportaciones de embriones de ovino aumentaron un 34,3%, lideradas por Canadá seguido de Australia, todos los embriones exportados fueron producidos in vivo (Viana, 2019); estos datos demuestran que la preservación de material genético en bancos de germoplasma es una necesidad para la optimización en procesos de transferencia de embriones, permitiendo aceptables tasas de supervivencia y convirtiéndose en herramientas útiles para obtener una ganancia genética en la explotación.

La ovinocultura en Colombia tiene inmensas posibilidades de desarrollo por sus bondades zootécnicas (adaptación, prolificidad, fertilidad, ciclo productivo más corto); sin embargo hay todavía limitaciones en la eficiencia productiva en algunas razas y la diseminación genética superior es baja (Arévalo Garay & Correa Assmus, 2013). En ovinos la aplicación de biotecnologías reproductivas como transferencia de embriones (ET), y criopreservación de embriones (Congelación lenta y

Introducción

vitrificación) se han estado desarrollado en algunas partes del mundo, incluyendo Australia, Sudáfrica, Brasil, Uruguay, México, y Argentina para uso en empresas ganaderas (Paramio & Izquierdo, 2014). Su aplicación para pequeños productores en condiciones tropicales y particularmente en Colombia es mínima y muy pocos son los resultados reportados. Una de las limitantes de mayor importancia en su masificación es el alto costo de tecnología alrededor de estas técnicas. Sin embargo, un trabajo realizado en Tailandia, (Khunmanee et al., 2020) concluye sobre la viabilidad y aceptación de estas tecnologías y la conveniencia del uso de la vitrificación en criopreservación embriones.

Las técnicas de criopreservación de embriones se han clasificado en dos grandes grupos: a) curvas de enfriamiento tradicionales en un rango de lentas a muy rápidas (lenta, rápida con enfriamiento en dos etapas, rápida con enfriamiento en una etapa, muy rápida y convencional) y b) curvas de enfriamiento no tradicionales, ultrarrápidas (dos etapas, directa, ultrarrápida y vitrificación). La técnica de vitrificación es una técnica ultrarrápida de bajo costo (no se necesita equipo de criopreservación) que puede ser la técnica de elección para criopreservar embriones ovinos en nuestro medio. Además de la elección, formas de adición y dilución del crioprotector es importante considerar los tipos de empaques de congelación; asimismo, se debe considerar el origen de los embriones ovinos (*in vivo* frente a *in vitro*) y la etapa de desarrollo. (Moore & Hasler, 2017) Muchos empaques para la vitrificación se han desarrollado con el principal objetivo de reducir el efecto deletéreo de los crioprotectores, dado que la respuesta y costos son variables.

Los crioprotectores utilizados se deben remover a través de una serie de pasos, no permitiendo la transferencia directa del embrión como sucede en las técnicas de criopreservación convencionales. Como ejemplo, en bovinos se han realizado varios ensayos que comparan diferentes sistemas de empaques abiertos y cerrados, permitiendo la transferencia directa de embriones ovinos, donde la importancia en la criopreservación radica en la eficiencia de ésta y la flexibilidad en

el momento de realizar la transferencia de embriones de una manera práctica en campo y con bajos costos. Para la implementación de esta técnica, el dispositivo más utilizado para la vitrificación de embriones es el cryotop (Kuwayama et al., 2005), reportando resultados del 50% en tasas de preñez de distintas especies en equinos, bovinos, conejos, búfalos, entre otros; sin embargo, los altos costos de Cryotop, valorado en promedio con un valor en el mercado de 20 € (aproximadamente 90.000 COP) por dispositivo, limita su acceso y su uso a nivel práctico (Marco-Jiménez et al., 2016). Con base en lo anterior, se han realizado experimentos de vitrificación de embriones en bovinos utilizando pajillas para llevar a cabo el calentamiento en un solo paso y permitir la transferencia directa; no obstante, la tasa de gestación obtenida en general es baja con un valor promedio de 26.8%; (Kruse, 2012). Por lo anterior, se justifica la importancia en la obtención de información alrededor de su aplicación y eficiencia en ovinos en Colombia, donde la información es escasa. Por este motivo el objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto del protocolo de vitrificación y sistema de empaque sobre la tasa de supervivencia de embriones ovinos obtenidos *in vivo*; primero se logra determinar la eficiencia de la ultrasonografía en diagnóstico de la respuesta superovulatoria; luego se estimaron las tasas de recuperación, tasas de desarrollo embrionario y calidad de embriones por medio de un protocolo de superovulación para finalmente evaluar el efecto de la vitrificación y el sistema de empaque (abierto y cerrado) sobre la tasa de supervivencia obteniendo la viabilidad. La ejecución de este trabajo, fue posible por el apoyo de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos sede Tunja con el préstamo de los animales, equipos y comisión de estudios para desarrollo del trabajo, en paralelo con el crédito beca Convocatoria No. 733 de 2015 Formación de Capital Humano de Alto Nivel del Departamento de Boyacá, Colciencias - modalidades de maestría Fundación para el Futuro de Colombia – COLFUTURO y la colaboración de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia con el préstamo del laboratorio de Genética Humana.

1. REVISIÓN DE LITERATURA CRIOPRESERVACIÓN EMBRIONES OVINOS

1.1 Criopreservación

Es el uso de temperaturas muy bajas para preservar las estructuras celulares vivas. Los efectos biológicos de refrigeración están dominados por la congelación del agua, resultando en la concentración de solutos disueltos en la fase líquida restante. Diferentes teorías sobre los daños y lesiones por congelación se centran en el ejercido por los cristales de hielo sobre las estructuras celulares, destruyéndolas por acción mecánica directa o a efectos secundarios a través de cambios osmolares de la fase líquida (Kopeika et al., 2015).

1.2 Crioprotectores

Son sustancias que reducen la cantidad de hielo formado a bajas temperaturas a través del aumento en la concentración total de todos los solutos en el sistema; la reducción de hielo se produce a cualquier temperatura, permitiendo la conservación de células sin afectar su supervivencia (Elliott et al., 2017). Para ser biológicamente aceptables, los crioprotectores deben tener la capacidad de penetrar en las células y poseer baja toxicidad, como ejemplo se menciona el glicerol (Gro), dimetilsulfóxido, etilenglicol y propanodiol.

1.3 Etapas de la criopreservación

La crio preservación embrionaria contempla cuatro etapas (Massip et al., 1989):

- a) Proceso de deshidratación, mediante suspensión de los embriones en soluciones con crioprotectores.
- b) Enfriamiento en condiciones que evitan o disminuyan la formación de cristales intracelulares al sumergirse en nitrógeno líquido (-196 °C).
- c) Calentamiento de los embriones a temperaturas fisiológicas para reasumir las funciones celulares.
- d) Remoción o dilución de los crioprotectores.

1.4 Métodos de criopreservación de embriones

En general se han reportado dos metodologías:

1.4.1 Metodología convencional

También llamada de congelación lenta, la cual consiste en adicionar bajas concentraciones de crioprotectores para disminuir el efecto tóxico y daño osmótico. La congelación de embriones por método convencional se basa en el uso de máquinas programables para ejecutar preestablecidas curvas de congelación, los crioprotectores más utilizados en este método para embriones ovinos son etilenglicol y glicerol Varago et al., 2014 se reportan diferentes protocolos y curvas de congelación lenta en ovinos (Willadsen et al., 1976), (Martinez & Matkovic, 1998), (Cocero et al., 2000).

1.4.2 Método de vitrificación.

Es una criopreservación ultrarápida realizada con concentraciones altas de crioprotectores para generar una textura vítrea y reducir la formación de cristales de hielo. En esta técnica es importante establecer una muy corta exposición al crioprotector y un volumen bajo de soluciones con el fin de evitar la toxicidad en las células (Pereira et al., 2009).

La vitrificación busca detener el metabolismo de las células de forma reversible, exponiéndolas al crioprotector y eliminando el agua intracelular

para lograr una deshidratación y manteniendo la integridad celular a temperaturas de -196°C . La figura 1 esquematiza el proceso de vitrificación.



Figura 1. Proceso vitrificación.

La vitrificación de embriones requiere secuencias y tiempos de lavado precisos en cada medio crioprotector, ya que se usan concentraciones muy altas y existen riesgos de toxicidad si se sobreexponen durante mucho tiempo.

La figura 1 muestra el proceso de vitrificación donde las células se congelan a velocidades extremadamente rápidas, (15,000 hasta 30,000 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) debido a que los embriones son sumergidos directamente en nitrógeno líquido, después de bañarlos en una secuencia de crioprotectores de alta concentración, que al ingresar al interior de las células generan la salida del agua a nivel del espacio extracelular; por esta razón, la vitrificación reduce la formación de hielo intracelular, que es la causa principal de la muerte celular, al congelar la muestra en un estado "vitreo" antes de que las moléculas tengan la oportunidad de formar estructuras cristalinas. Esto da como resultado una mayor tasa de supervivencia celular después de la descongelación de los embriones en comparación con la congelación lenta (convencional).

Las dos técnicas de criopreservación tienen diferencias en sus procesos y actualmente se obtienen mejores resultados con la metodología convencional debido al mayor uso en su aplicación en rumiantes en etapas

de mórula y blastocisto; no obstante, en ovinos (dos Santos Neto et al., 2015) la técnica de vitrificación es más sencilla, rápida y económica, obteniéndose mejores resultados en etapas embrionarias tempranas. La tabla 1 expone las diferencias de estas dos técnicas.

Tabla 1. Comparación de vitrificación y congelación convencional de embriones.

Parámetro	Vitrificación	Congelación convencional
Duración	10 min	3 h
Choque térmico prolongado	No	Si
Velocidad de enfriamiento	15,000 – 30,000 °C/min	1 °C/min
Concentraciones Crioprotector	(6–8 M)	(1.5 M)
Dispositivos	Abiertos – cerrados	Pajilla
Volumen de crio protectores	1–2 µl	Mayor volumen
Equipos Gastos	Económico	Costoso

Fuente: Modificado de Arav (2014).

1.5 Efectos en las estructuras celulares por proceso criopreservación.

La formación de hielo intracelular es nociva para las células y la presencia de crioprotectores es fundamental para la sobrevivencia del embrión congelado; al conocer la permeabilidad al agua de la membrana celular es posible predecir el efecto de la velocidad de enfriamiento entorno a la supervivencia celular y la tasa óptima será un balance entre el riesgo de congelación y los daños intracelulares. Adicionalmente, en los procesos de criopreservación se presenta formación de hielo extracelular, el cual afecta las células densamente empaquetadas o sistemas multicelulares complejos por tensiones mecánicas generadas. Sin embargo, el hielo puede evitarse modificando las tasas de enfriamiento o mediante la producción de un estado vítreo, definido por el alcance de una viscosidad suficientemente alta para comportarse como un sólido sin generación de cristalización. De todas formas, se generan efectos adversos con la aplicación de estos procesos debido a la alta concentración de solutos de todos los sistemas de

criopreservación, los cuales se asocian a daños en las organelas celulares. En la tabla 2 se exponen los principales tipos de daños de acuerdo con la estructura celular afectada por numerosos obstáculos de la difusión libre de solutos (membranas), provocando cambios en los volúmenes y perjudicando la integridad de los embriones; por lo tanto, los procesos de difusión y ósmosis tienen efectos importantes durante la introducción y eliminación de crioprotectores, en el proceso de congelación y descongelación.

Tabla 2. Principales efectos del proceso criopreservación sobre las estructuras celulares.

Estructura	Tipos de daños	Referencias
Núcleo y envoltura nuclear (NE) , ADN (ácido desoxirribonucleico) de replicación, transcripción, ARN (Ácido ribonucleico) de procesamiento, y el conjunto de subunidad ribosómica	La NE se compone de las membranas exterior e interior La criopreservación puede afectar a la integridad estructural de la NE y por lo tanto afectar a la replicación del ADN y la transcripción.	(Asgari et al., 2012)
Citoplasma	La criopreservación puede ocasionar un grave daño a los microtúbulos y a los microfilamentos; después de la descongelación. Los microtúbulos son componentes del citoesqueleto de la célula y se componen de actina polimerizada forman parte de tubulina polimerizada y son componentes esenciales del citoesqueleto generando afectación a la organización espacial y la posterior migración de los cromosomas durante divisiones meióticas.	(Hosseini et al., 2012)
Los microfilamentos , La síntesis de proteínas, la formación del citoesqueleto	La criopreservación puede afectar la función de microfilamentos que conduce a problemas en las funciones anteriores. Las mitocondrias juegan un papel vital en el metabolismo de los orgánulos citoplasmáticos esenciales proporcionando trifosfato de adenosina. Importantes en la fertilización y el desarrollo del embrión de preimplantación. Hinchamiento mitocondrial y su distribución anormal se han observado después de la crioconservación congelación convencional, y la vitrificación.	(Skidmore et al., 2009)
Zona pelúcida (ZP) . Es una glicoproteína de membrana que rodea embriones tempranos, se compone de tres glucoproteínas ZP1, ZP2, ZP3.	Genera liberación prematura del contenido de los gránulos corticales, disrupción de la membrana plasmática, desorganización extensiva del ooplasma y alteraciones en el citoesqueleto.	(Talwar & Prakash, 2015)

1.6 Comparación entre la congelación convencional y la vitrificación

Existe una alta diversidad de métodos y protocolos para criopreservación dependientes en alto grado del tipo y concentración de los crioprotectores. En la técnica convencional para la congelación de células y tejidos se utilizan concentraciones relativamente bajas (1,5 M). Desafortunadamente las células sometidas a procesos de congelación lenta sostienen criolesiones debido a la formación de cristales de hielo, el medio ambiente hiperosmolar y la deshidratación (Gratwohl *et al* 2010).

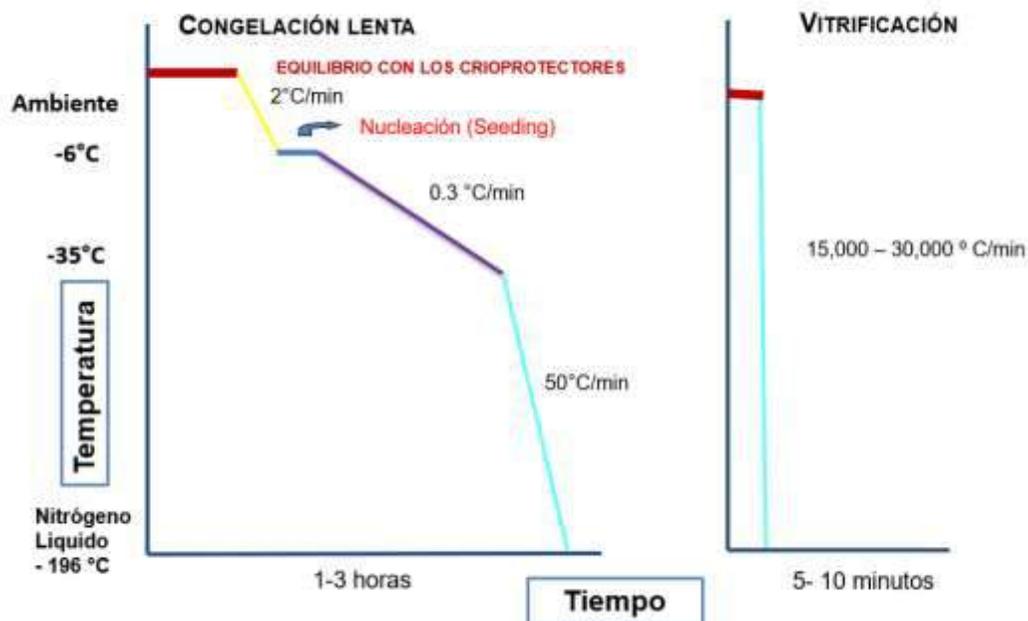


Figura 2. Curvas congelación convencional y vitrificación

En la figura 2 se realiza un paralelo de las curvas de congelación convencional (lenta) y vitrificación en donde se comparan las velocidades, temperaturas y tiempos de las fases de los dos procesos de criopreservación.

La vitrificación evita la generación de cristales de hielo, requiere mayores concentraciones del Crioprotector (CPA) (6.8 M) y altas velocidades de enfriamiento ($\approx -1,500$ °C /min) (Stubbs *et al.*, 2020). Para esto, el enfriamiento rápido se puede lograr mediante la inmersión de células / tejidos directamente en nitrógeno líquido, donde las altas concentraciones

de CPA utilizado en la tecnología de vitrificación buscan reducir el punto de congelación de la solución y aumentar la viscosidad en los medios de vitrificación. No obstante, altos niveles de CPA pueden causar choque osmótico y toxicidad en las células, resultando en alteraciones del citoesqueleto (Leibo & Pool, 2011); por lo tanto, un aumento en la velocidad de enfriamiento en los procesos vitrificación facilita una transición rápida de temperatura, permitiendo disminuir las criolesiones en la membrana celular y el citoesqueleto. De la misma manera, la congelación es más baja debido a las concentraciones de crioprotectores, disminuyendo los efectos tóxicos y osmóticos en células y tejidos (Bettencourt et al., 2009). Para hacer frente a estos retos, varios sistemas de empaque de vitrificación (abiertos y cerrados) han sido diseñados, relacionándolos con la velocidad de temperatura.

1.7 Factores que intervienen en el éxito de procesos de criopreservación

Las tasas de preñez y nacimientos de corderos están influenciadas por una variedad de factores alrededor de los métodos de transferencia de embriones, protocolo de congelación y/o vitrificación, rehidratación o descongelación, etapa de desarrollo, calidad embrionaria y empaques.

Los embriones menos avanzados de mórula compacta o de mayor desarrollo de blastocisto expandido presentan bajas tasas de supervivencia. (Khunmanee S, *et al.* 2020.) Asimismo, los embriones de baja calidad en función a sus características de desarrollo y morfología ofrecen menores posibilidades de implantación, ocasionando bajas tasas de preñez; en consecuencia, son raramente criopreservados.

Si bien se ha incrementado la tasa de supervivencia, se requieren más estudios en la selección de concentraciones del crioprotector y en optimizar la criotolerancia de embriones en ovejas y otras especies (dos Santos-Neto et al., 2017); dentro de las cuales se busca disminuir el contenido de lípidos (Romão et al., 2015) Igualmente, las tasas de preñez se ven afectadas por

una inadecuada manipulación de embriones durante los procedimientos de congelación o descongelación, por la transferencia de embriones a hembras receptoras cuyos ciclos estrales no estén adecuadamente sincronizados con el de la hembra donante; además, embriones producidos *in vitro* o manipulados de alguna manera (por ejemplo, biopsia o división) producen tasas de preñez inferiores.

1.8 Diferentes crioprotectores y métodos de criopreservación

Los trabajos sobre crioprotectores buscan mejorar los resultados en los procesos de criopreservación. Las Tablas 3 y 4 exponen resultados entorno a tasas de re-expansión y eclosión de embriones ovinos con diferentes crioprotectores y sistemas criopreservación; algunos estudios pueden ser contradictorios, sumado a la influencia de diferentes empaques utilizados.

Tabla 3. Reexpansión tasas de embriones ovinos criopreservados por congelación convencional y vitrificación.

Crio protector	N	Embriones Re-expandidos tras la criopreservación (%)		
		6h	12h	24h
Congelación lenta o Convencional.	15	1(6,66)	4(26,66)	5(33,33) ^a
DMSO vitrificación	15	2(13,33)	3(20,00)	4(26,66) ^a
DMF vitrificación	15	4(26,66)	8(53,33)	8(53,33) ^b

a Porcentajes con diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0,05$).

DMSO: sulfóxido de dimetilo, Dimetilformamida (DMF)

(de Araújo-Lemos et al., 2014).

Los efectos favorables de etilenglicol comparado con el glicerol (Gro) y el propilenglicol, se deben al mejor comportamiento con respecto al shock osmótico debido al bajo peso molecular y citotoxicidad, por la rápida penetración en el interior celular y la rápida salida del embrión después del calentamiento. Este efecto se observó en los embriones criopreservados con el método convencional y no en embriones vitrificados (Bhat et al., 2015).

Tabla 4. Reexpansión y tasas de eclosión de embriones ovinos crio preservados por la congelación convencional con etilenglicol y vitrificación en OPS con etilenglicol y dimetilformamida.

Tipo de congelación	Re-expansion % (n) 24 h	Eclosionados % (n) 48 h
Gr. 1 Congelación convencional	54.0 (20/37)	40.5 (15/37) ^a
Gr. 2 vitrificación con etilenglicol	47.0 (16/34)	35.3 (12/34) ^a
Gr.3 vitrificación con dimetilformamida.	36.6 (12/33)	15.5 (5/33) ^b

a, b Los valores medios de la columna con diferentes superíndices difieren significativamente ($p < 0,05$). (Varago et al., 2014).

Varago et al. (2014) utilizaron dimetilformamida (DMF) y etilenglicol (EG) como crioprotectores para vitrificar embriones ovinos donde las concentraciones y tiempo de exposición utilizados no fueron eficientes en comparación con la congelación convencional. De otro lado Araújo-Lemos et al. (2014) reportaron mezclas de EG y DMF de mayor eficiencia que la vitrificación con dimetil sulfóxido (DMSO). Por otra parte, los embriones criopreservados con DMF fueron capaces de establecer preñez a una tasa similar a la de vitrificación con DMSO. Bhat et al. (2014) afirman que la vitrificación con OPS (Open-Pulled Straw) generó mayores tasas de supervivencia de embriones de oveja producidos *in vitro* e *in vivo* que la congelación tradicional. Asimismo, existen resultados de investigación sobre los cambios ultraestructurales de embriones ovinos vitrificados mediante OPS y congelación convencional. Las lesiones encontradas fueron similares, independientemente de la etapa embrionaria y lesión de la estructura celular en mitocondrias y citoesqueleto. La comparación de daños y métodos utilizados se muestran en la Tabla 5. Los embriones frescos revelaron intensa actividad mitocondrial distribuyéndose por todo el citoplasma independientemente de la etapa de desarrollo embrionario; no obstante, la evaluación en la actividad mitocondrial después de la crioconservación es inédita en esta especie y es de conocimiento que las disfunciones o anomalías mitocondriales pueden comprometer los procesos de desarrollo mediante la inducción de trastornos de segregación cromosómica, fallos de maduración y fertilización o fragmentación del embrión (De Paula et al., 2013).

Otro estudio realizado por Dalcin et al. (2013) también reporta pequeños daños del citoesqueleto después de la descongelación para embriones calidad 1 y 2. Por el contrario los embriones grado 3 mostraron un alto nivel de desorganización del citoesqueleto; esto sumado a lo reportado también por (Romão et al., 2016) sobre sustancias como la citocalasina, que induce la despolimerización de microfilamentos antes y durante la vitrificación, actuando como inhibidor de microfilamentos, evitando la polimerización de la actina y generando que la membrana plasmática y el citoesqueleto tengan mayor elasticidad.

Tabla 5. Daños ocasionados procesos vitrificación y congelación convencional embriones ovinos.

Tipos de daño	Descripción	Referencia
El daño por frío (-5 A -50 ° C)	Provoca cambios irreversibles en las estructuras celulares - gotas de lípidos, proteínas, membranas ricas en lípidos, y los micro túbulos siendo más sensible en las primeras etapas de embriones	(E. M. V. Bettencourt et al., 2009)
Choque osmótico durante el equilibrio (-5 A -50 ° C)	Es generado por crioprotectores permeables y no permeables que inducen lesión tóxica y osmótica a la célula que aumenta a mayor concentración de los crioprotectores, temperatura de equilibrio y el tiempo de contacto del CPA (agente crioprotector) produciendo deformación como resultado del efecto osmótico.	(Baril et al., 2001)
Endurecimiento de la zona pelúcida	Producido por liberación prematura del contenido de los gránulos corticales debido a la citotoxicidad y la baja temperatura ocasionando el endurecimiento de la zona pelúcida.	(Dalcin et al., 2013)
Lesiones de fractura (Entre -50 y -150 ° C)	Se producen con frecuencia en todos los métodos de criopreservación por cambios de presión extrema causadas por el calentamiento o enfriamiento rápido de las burbujas de aire al inducir dislocaciones en la solución parcialmente solidificada y también fuerzas mecánicas llegan a lesionar la zona pelúcida, cualquier lesión a este nivel es casi no reversible y se sabe que el uso mínimo de volumen de las soluciones utilizadas también minimiza la probabilidad de fracturas	(Yavin & Arav, 2007)
Zona segura (-196 ° C)	Temperatura muy segura para el almacenamiento de los gametos ya que las células aquí están en animación suspendida y los niveles de radiación son muy bajos para dañar los embriones criopreservados	A. Shirazi 2010

En otro estudio (Bettencourt et al., 2009; Green et al., 2009) se muestran porcentajes de preñez y supervivencia utilizando diferentes protocolos (Tabla 6) de criopreservación y dispositivos de empaque de vitrificación (OPS). Los buenos resultados sugieren su utilización en condiciones de campo ofreciendo la posibilidad de una reducción de costos en la transferencia de embriones.

Tabla 6. Diferentes porcentajes preñez y de corderos nacidos de embriones ovinos criopreservados.

Tipo de resultado	Embriones	numero de embriones (n)	Preñez (%)	Supervivencia embriones (%)	Referencia
Porcentaje preñez, de parto y de supervivencia de embriones después de la transferencia de embriones frescos o crio preservados utilizando tres métodos	Frescos	30	(73,3) 11/15	(50,0) 15/30	(E. M. V. Bettencourt et al., 2009)
	Total, Crio preservados	96	(58,3) 28/48	(38,5) 37/96	
	Congelación lenta	38	(68,4) 13/19	(44,7) 17/38	
	Vitrificación	36	(50,0)9/18	(33,3) 12/36	
	OPS	22	(54,6) 6/11	(36,4) 8/12	
Porcentaje preñez, después de la transferencia de congelados o vitrificados embriones de acuerdo con la etapa de desarrollo de los embriones	Embriones	n	Preñez (%)	Transferencia	(Green et al., 2009)
	Congelación lenta	23	34,8	Directa	
		21	42,9	Indirecta	
		21	57,1	Directa	
	OPS	22	54,5	Indirecta	

1.9 Dispositivos utilizados en la vitrificación

Se han desarrollado diferentes empaques en búsqueda de reducir el volumen de los crioprotectores; estos dispositivos se han dividido en dos categorías: dispositivos de superficie y dispositivos tubulares (Yavin & Arav, 2007).

1.9.1 Los dispositivos de superficie

Son gradillas de microscopía electrónica (Martino et al., 1996), Cryotop® (Kuwayama et al., 2005) Cryoloop™ (Lane et al., 1999), de superficie sólida (Dobrinsky, 2001), de malla de nylon (Matsumoto et al., 2001), Cryoleaf™

(Chian et al., 2005), espátula de vitrificación (Tsang & Chow, 2009), y Cryo-E™ . (Passmore & Russo, 2016)

1.9.2 Los dispositivos de tubo

Entre ellos se encuentran la pajilla de plástico (Youngs, 2011) la pajilla estirada abierta (OPS; (G Vajta et al., 1999) la pajilla de sistema cerrado (Kruse, 2012), la pipeta flexipet (Liebermann et al., 2002) las OPS superfinas (Isachenko et al., 2003), CryoTip® (Kuwayama et al., 2005b) y la punta de pipeta (Sun et al., 2008)

1.9.3 Empaques abiertos y cerrados en la vitrificación

Los empaques cerrados se crearon para mantener separados a los embriones físicamente del nitrógeno líquido durante todo el procedimiento de enfriamiento, almacenamiento y calentamiento, mientras que sistemas abiertos permiten el contacto directo entre embriones y nitrógeno líquido (Bielanski & Vajta, 2009). Los empaques totalmente abiertos incluyen la OPS sin protección (G Vajta et al., 1999), el Cryotop original (Hamawaki, A. et al., 1999), Cryotech, Cryolock (García et al., 2011), Cryoleaf (Gábor Vajta & Nagy, 2006b), (Saragusty & Arav, 2011) Vitri-Inga (Almodin et al., 2010), pajilla de protección no sellada y el Cryoloop almacenado en criotubos. Mediante la utilización de estos sistemas, las muestras entran en contacto con el nitrógeno líquido directamente durante el enfriamiento; en consecuencia, las muestras están expuestas desde el contacto y existe el potencial de contaminación cruzada durante el almacenamiento. Por otro lado, las tasas de enfriamiento y calentamiento son extremadamente altas (Bielansky y Vajta, 2009). (L. Parmegiani et al., 2011) En 2013, el grupo de investigadores de (Panagiotidis et al., 2013) y (Lodovico Parmegiani et al., 2012) publican trabajos donde comparan el sistema de empaque abierto y cerrado en la vitrificación de blastocistos humanos, en el cual no

encontraron diferencias en cualquiera de los parámetros evaluados, incluyendo tasas de nacidos vivos.

1.9.4 Viabilidad estudios en Vitrificación pajillas 0,25 CC:

Diversos investigadores (Kruse, 2012; Kuwayama, 2007); Kruse, 2012; (Ha et al., 2014), han intentado vitrificar embriones mamíferos en pajilla con el fin de mejorar los procesos de criopreservación de embriones con las ventajas de la congelación convencional y transferencia de embriones a las receptoras en la misma pajilla donde fueron vitrificados. (G Vajta et al., 1999), vitrificaron embriones bovinos producidos *in vitro* en pajillas, el protocolo utilizado tiene como primera solución el medio de equilibrio que consistió en 12.5% de etilenglicol y 12.5% de dimetilsulfóxido en un rango de temperaturas entre 20 a 22 °C durante 60 s y la segunda solución para la vitrificación fue de 25% de etilenglicol y 25% de dimetilsulfóxido a 4 °C durante 60 s; las pajillas fueron situadas en vapor de nitrógeno líquido por 2 minutos y posteriormente sumergidas para su almacenamiento. La tasa de reexpansión de blastocistos obtenida fue del 67%. Similarmente (Taniguchi et al., 2007) vitrificaron embriones bovinos en pajilla sumergiendo primero la mitad de ésta, posteriormente se depositaron los embriones dentro de la pajilla y lentamente se sumergía la otra mitad en el nitrógeno líquido; luego del calentamiento, los embriones fueron cultivados por 72 horas, obteniéndose que estos embriones vitrificados con 40% de glicerol (Gro) tendieron a ser mayores que los vitrificados con 30% de Gro + 10% de EG o 20% de Gro + 20% de EG sobrevivieron y se desarrollaron hasta la etapa de blastocistos eclosionados obteniendo como tasa de eclosión ($26\% \pm 11,5$ de un $n=23$ vs. $7\% \pm 7,1$ y $8\% \pm 5,1$ cuyo $n = 22$ respectivamente), concluyendo que este método es muy práctico y aplicable para transferencia directa de embriones vitrificados.

Así mismo (Rodriguez-Villamil et al., 2014) reporta el éxito del uso vitrificación de superficie sólida mediante el uso de soluciones simplificadas a base de EG y la dilución en pajilla con medio de retención, (solución de

sacarosa de 0,25 M) puede ser una alternativa práctica para la criopreservación y la transferencia directa de embriones bovinos producidos *in vitro*, obteniendo con el uso de 0.25 M de sacarosa (67.7 ± 2.3 y 47.0 ± 1.7) mejores tasas de supervivencia del embrión a nivel *in vitro*. Akiyama et al., 2010 realizaron un estudio evaluando un método para transferencia directa de embriones bovinos sexados vitrificados en pajilla. Los embriones fueron transferidos directamente a receptoras, logrando tasas de gestación de 34.8%, lo cual demostró ser una técnica efectiva para producir gestaciones a término. Yu et al., 2010 vitrificaron embriones bovinos producidos *in vivo* comparando tres sistemas, OPS (pajilla estirada cerrada y pajilla estirada abierta) y por curva lenta. La tasa de sobrevivencia posterior al descongelamiento fue similar; sin embargo, la tasa de sobrevivencia a 24 y 48 horas fue inferior para embriones criopreservados por curva lenta. Los autores concluyeron que el sistema de vitrificación en pajilla estirada cerrada puede eliminar el riesgo de contaminación de los embriones mediante nitrógeno líquido, sin disminuir su viabilidad. Igualmente, (Kruse, 2012) vitrificó blastocistos bovinos producidos *in vitro*, con el fin de transferirlos directamente a las receptoras. Los blastocistos fueron expuestos a 5 M de etilenglicol (V1- primera solución equilibrio) durante 3 minutos, posteriormente se expusieron a 6.5 M de etilenglicol + 0.5 M galactosa (V2 – segunda solución equilibrio) y finalmente se empacaron en pajillas de 0.25 cc con una columna de 120 ul de 1 M galactosa, seguido por una burbuja de aire, una columna pequeña de solución de vitrificación con los embriones (2 por pajilla). La tasa de gestación fue de 26.8%. Por su parte (Ha et al., 2014) vitrificaron blastocistos bovinos producidos *in vitro* en una pajilla y plástico de 0.25 cc modificado, con blastocistos unidos a la superficie interna de una pajilla de plástico, y el otro método con blastocistos unidos a la superficie interna de una pajilla modificada, obteniendo tasas de preñez de 86.4% y 88.2%, respectivamente

y concluyendo que estos dos métodos se pueden utilizar para vitrificación con resultados similares a los de la criopreservación convencional.

En el caso de ovinos (Juárez-Pérez et al., 2018) reporta un estudio para la vitrificación de "un paso", utilizando embriones obtenidos *in vivo* de 16 ovejas raza pelibuey 8 por cada estación (primavera y otoño); se suspendieron durante diez minutos en 1,5 M de Etilenglicol (EG) + 0,2 M de sacarosa en TCM 199; los embriones se cargaron en pajillas de 0,25 cc y se sumergieron en nitrógeno líquido. Y en los resultados reporta un promedio de viabilidad embrionaria del 59,3%, independientemente de la estacionalidad reproductiva en las ovejas tropicales superovuladas. La valoración microscópica no mostró diferencias ($P>0.05$) en la viabilidad embrionaria 50 y 68.75 %, calificación morfológica 2.43 ± 0.60 vs. 3.31 ± 0.58 y porcentaje de células vivas 49.37 vs. 53.75 % para primavera y otoño, respectivamente.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del protocolo de vitrificación y sistemas de empaque sobre la tasa de supervivencia de embriones ovinos

2.2 Objetivos específicos

- Comparar el uso de la ultrasonografía transrectal y laparoscopia con la laparotomía, en el diagnóstico de la respuesta superovulatoria a nivel de ovarios en ovejas superovuladas.
- Estimar la respuesta superovulatoria, tasa de recuperación, grado de desarrollo embrionario y calidad de embriones ovinos obtenidos in vivo.
- Evaluar el efecto de la vitrificación y el sistema de empaque (abierto y cerrado) sobre la tasa de supervivencia de embriones ovinos obtenidos in vivo.
- Determinar la capacidad de supervivencia a los procesos de vitrificación y empaque, de acuerdo a la tasa de preñez, de embriones ovinos producidos in vivo.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación experimental, animales y diseño.

Para la realización de este estudio se contó con un grupo de profesionales de amplia experiencia certificada en biotecnologías reproductivas en pequeños rumiantes; asimismo, se contó con el aval del comité de bioética de la Facultad Medicina Veterinaria y de Zootecnia Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, mediante sesión del 28 junio del 2016 Acta 06.

Los animales utilizados en esta investigación, fueron hembras ovinas comerciales Trihíbridas, cruces de razas Katahdin, Pelibuey y Dorset. Se seleccionaron 25 hembras adultas entre el primero y sexto parto, las cuales presentaron buenas condiciones sanitarias y nutricionales. Se sincronizaron las 25 ovejas, pero solo se tuvieron en cuenta 24, las cuales se dividieron en dos grupos; doce (12) hembras primíparas y doce (12) hembras multíparas (más de un parto), con condiciones corporales entre 3-4, pesos con rangos de 30 - 45 kg y edades entre 18 - 74 meses (Figura 3).



Figura 3. Hembras trihíbridas donadoras Proyecto Ovino FUJDC A primíparas, B multíparas

Por medio de ultrasonografía transrectal mediante sonda lineal 6,0 - 8,0 megahercio (MHz). (Esaote Aquila) se evaluó la integridad reproductiva. Asimismo, tres machos reproductores entre dos y tres años de edad fueron seleccionados y sometidos a exámenes andrológicos para garantizar un buen estado reproductivo, nutricional y sanitario; además se utilizó un cuarto macho vasectomizado como recelador. Todos los animales se mantuvieron en las instalaciones del aprisco en distintos módulos, resguardados de

inclemencias climáticas, y control de acceso a heno Angleton, pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) cortado y aproximadamente 200 gramos de alimento ganado comercial (pienso) con 18% de proteína cruda diarios por animal. Se aseguró libre acceso al agua y la suplementación mineral y energética (Melaza) fue suministrada a voluntad. El experimento se realizó en las instalaciones del aprisco y la clínica veterinaria San Francisco de Asís de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos en el municipio de Soracá, vereda Otro Lado, ubicada en la zona centro del departamento de Boyacá con coordenadas de 5° 30' de latitud norte y 73' de longitud oeste de Greenwich. L- Para la realización de este estudio se contó con un grupo de profesionales de experiencia certificada en biotecnologías reproductivas para pequeños rumiantes, encargados de realizar las intervenciones quirúrgicas de laparoscopia y laparotomía en espacios adecuados, bajo manejo de anestesia inhalatoria. Además, los animales utilizados en el proceso experimental no habían recibido anteriormente ningún tipo de tratamiento de superovulación y recuperación de embriones



Figura 4. Machos montas natural

3.2 Tratamientos de sincronización y superovulación

Se tomó la población total de 25 ovejas hembras trihíbridas cruces razas Katahdin, Pelibuey y Dorset cuyas edades se encontraban entre 18 a 74 meses, los pesos entre 30 a 45 Kg, su condición corporal entre 3 y 4, todas estaban ciclando. Las ovejas se dividieron en grupos según número de partos y a su vez se subdividieron aleatoriamente en cinco (5) grupos de cinco (5) hembras por grupo, donde cada semana durante dos meses fueron

sincronizadas mediante la inserción de esponjas vaginales impregnadas con 60 mg de Acetato Medroxiprogesterona (SYNTEX®) por trece (13) días. Al retiro se inyecta 300 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Novormon SYNTEX®). El tratamiento de superovulación, se realizó desde el día 11 hasta el día 14 con 250 UI de hormona folículo estimulante p-FSH y p-LH (Pluset®) dividido en ocho dosis decrecientes (55, 45, 40, 35, 30, 20, 15 y 10 U. I.) administradas por vía intramuscular en intervalos de 12h, en la Figura 5 se expone gráficamente este procedimiento. Posteriormente al detectarse el celo con el macho vasectomizado se procedió a realizar la monta natural controlada con tres machos reproductores mostrados en la Figura 4.

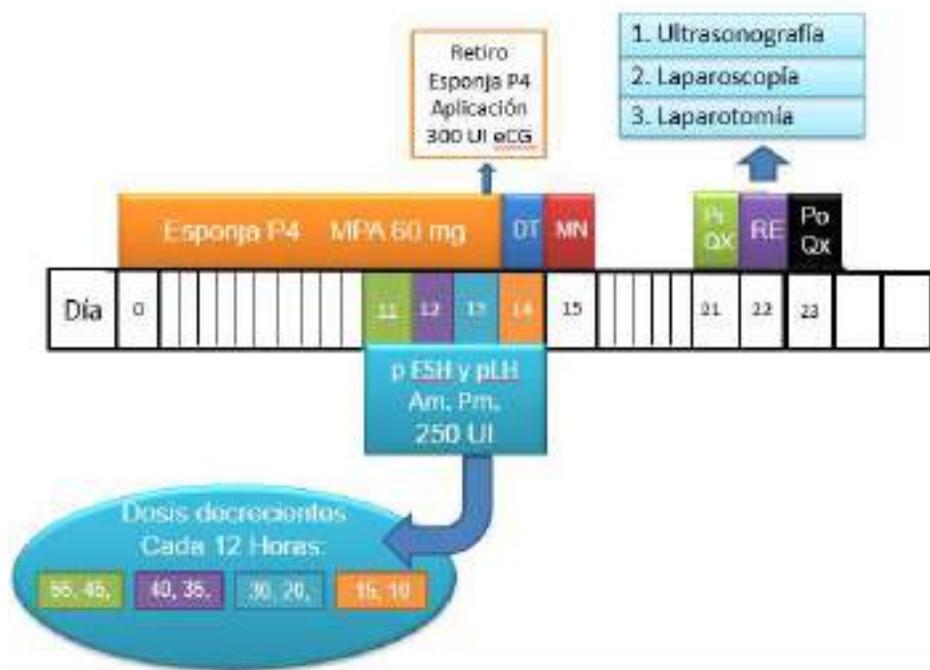


Figura 5. Diagrama procesos obtención embriones, vitrificación y evaluación de tratamientos

3.3 Evaluación respuesta tratamiento superovulatorio

3.3.1 Evaluación por medio Ultrasonografía

La ecografía transrectal se realizó via transcervical y con ayuda de brete contención figura 6. Las ecografías fueron realizadas con modo B (ESAOTE, Aquila pro vet, PIE MEDICAL) equipado con una sonda rígida de 6 - 8 MHz. Las ovejas fueron aseguradas en una posición de pie y la pared abdominal se comprimió hacia dorsal para facilitar la visualización del útero y los ovarios. Asimismo, el recto se lubricó y se evacuaron las heces fecales; posteriormente se utilizó gel de contacto hidrosoluble antes de la inserción del transductor. Se identificó en primer lugar la vejiga para lograr ubicar los cuernos uterinos; posteriormente, la sonda se giró lateralmente en ambos lados realizando un barrido de derecha a izquierda para obtener las imágenes de ovarios y detectar los folículos y cuerpos lúteos.

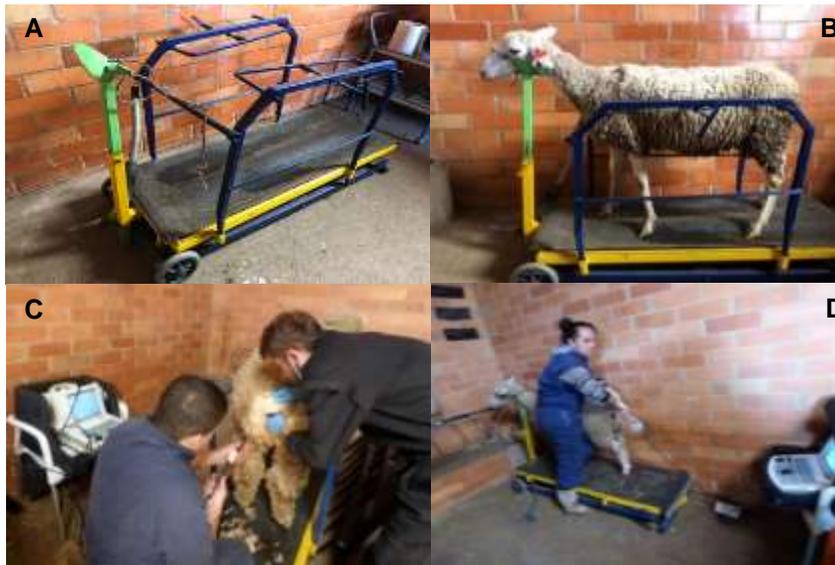


Figura 6. Proceso realización ecografía transrectal ovejas; A, brete contención; B, Sujeción; C, evacuación rectal y lubricación; D, ultrasonografía

El ovario se evaluó el día anterior y en los 4 días de la superovulación. Se visualizaron y midieron los folículos antrales mayores o iguales 3 mm de diámetro con una magnificación de la imagen. El diámetro medio (promedio de dos dimensiones, vertical y horizontal) de cada folículo identificado fue tomado a partir de imágenes fijas tras la identificación de los folículos se

realiza la identificación de los cuerpos lúteos a nivel ecográfico como se observa en la Figura 7.

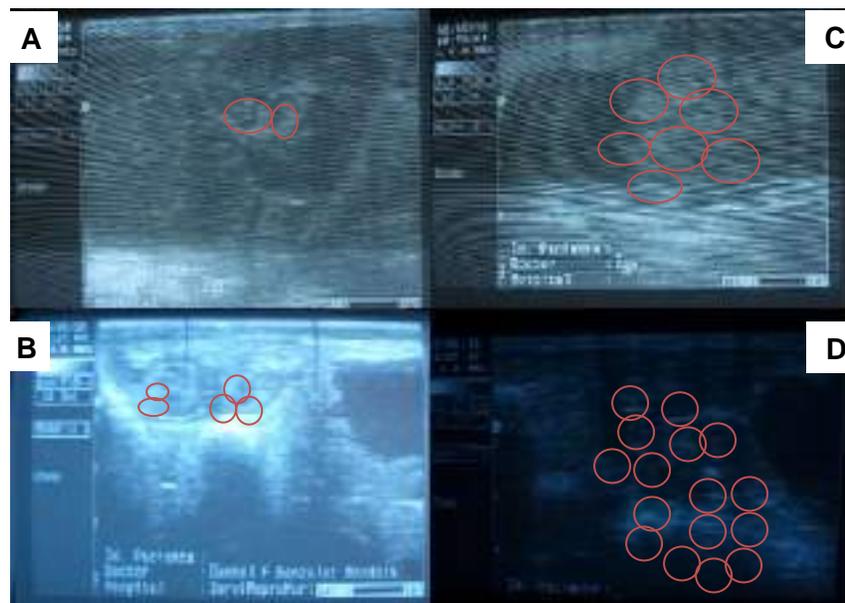


Figura 7. Ultrasonografías diferentes respuestas tratamientos superovulatorios; A, baja; B, moderada; C y D Alta

3.3.2 Evaluación por medio de Laparoscopia:

Al día siete de la monta, aquellas ovejas con buena respuesta superovulatoria, evaluada mediante la ultrasonografía, donde se determinó la cantidad de cuerpos lúteos, fueron sometidas a procedimiento de laparoscopia. Como preoperatorios se realizó un ayuno de 24 horas y restricción de agua durante 12 horas previas a la cirugía, con el fin de evitar la incidencia de timpanismos, bronco aspiraciones y regurgitaciones. Para esto, se esquiló la zona quirúrgica un día antes de la intervención y se realizó un examen clínico completo, encontrando parámetros estándar en todos los animales utilizados en este experimento. Para el procedimiento quirúrgico se realizó una sedación y anestesia con 0.05 mg/kg de peso vivo de xilacina y 0,4 mg/kg de peso vivo de Ketamina intravenoso; luego se realizó anestesia inhalatoria con isoflurano 1,3%, ubicándose el animal en una camilla inclinada en ángulo de 45°. (Figura 8). Asimismo, se realizó en el área de incidencia de los trocares y cánulas (instrumentos quirúrgicos que

hacen parte del laparoscopia), una rasuración previa y desinfección; luego se ubicó la zona de localización de trocares, realizándose dos incisiones para la introducción de las mismas; posteriormente se introdujo el endoscopio y se insufló con CO₂ el abdomen para ubicar el útero y se introdujo el segundo trócar (5mm) en el lado izquierdo del animal, justo delante de la vejiga. Por medio de la manipulación de cánulas y endoscopio se ubicaron los ovarios y se evaluó cantidad, tamaño y calidad de los cuerpos lúteos (Figura 9).

3.3.3 Evaluación por medio de Laparotomía:

Por último, se llevó a cabo la laparotomía donde se registraron el número de cuerpos lúteos por ovario (Figura 10). El proceso quirúrgico de laparotomía se realizó basado en guías de protocolo para la obtención de embriones por laparotomía en hembras ovinas (González, 2015).



Figura 8. Proceso quirúrgico; A, anestesia isoflurano; B, laparotomía recuperación de embriones

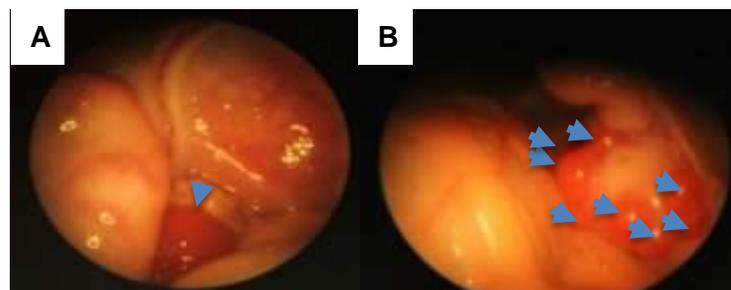


Figura 9. Evaluación laparoscópica tratamientos superovulación; A, respuesta Baja (observan pocos CL); B, respuesta Alta (se observan muchos CL).

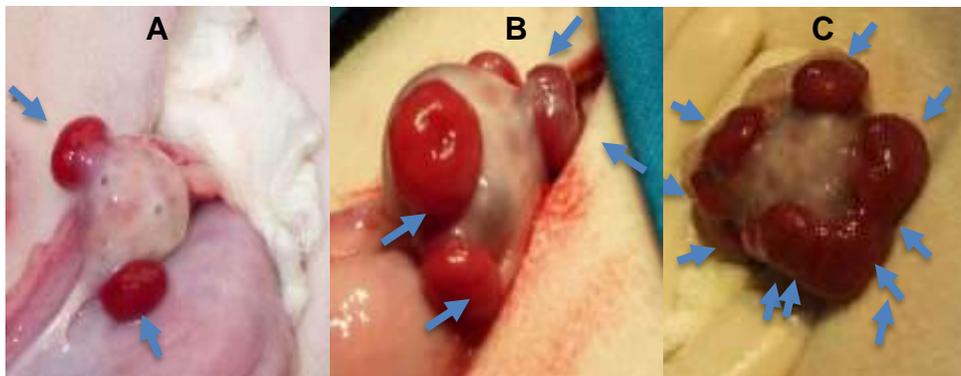


Figura 10. Evaluación respuesta superovularia laparotomía (control); A, respuesta Baja B respuesta Media; C, respuesta Alta

Posterior a la observación y conteo en cada una de las técnicas se procedió a organizar el número de cuerpos lúteos encontrados mediante ecografía y laparotomía que es el tratamiento control, donde se analizó la información mediante el cálculo de concordancias. Las variables medidas en esta investigación se clasificaron en independientes y dependientes.

3.4 Recolección de embriones

Se realizó la recuperación de embriones mediante laparotomía con lavado por arrastre (*flushing*). Se realizó anestesia Inhalatoria de isoflurano vaporizado en oxígeno a través de un circuito circular con absorción de CO₂ como se muestra en la figura 8 y figura 11; posteriormente, se expuso el útero y se realizó punción cerca de la unión útero tubárica con Catéter N° 16" y ¼" de longitud, colocando una sonda pediátrica folley de tamaño 12 x 5cc con dos vías en el interior de la luz del cuerno uterino aproximadamente a 2.0 cm de la bifurcación en mención; luego se realizó una segunda punción para introducir 20 ml de medio de colecta a 37°C por cada cuerno uterino, mostrada en la figura 12 y figura 13.



Figura 11. Oveja procedimiento quirúrgico **A** oveja camilla quirúrgica con traqueo tubo **B** anestesia general recuperación embriones

El medio empleado para la recuperación de los embriones fue una solución buffer de fosfato (PBS) con 1% de suero bovino y 1% de antibióticos (100 UI/ml penicilina y 50 UI/ml sulfato de estreptomicina) inyectada por medio de una sonda Foley una por cada cuerno ubicándolas en el tercio tubárico de los dos cuernos uterinos, izquierdo y derecho respectivamente conectando las sondas de Foley de cada cuerno al tubo Y para el lavado de embriones y posteriormente al filtro de recolección de embriones MiniFlush ambos de Minitube® realizando el lavado, simultáneamente en los dos cuernos. El fluido se recolectó en caja Petri figura 13 la cual fue utilizado para la búsqueda de embriones bajo un microscopio estereoscópico con magnitud de 40X; una vez encontrados fueron aspirados mediante pipeta y llevados a medio nutritivo PBS enriquecido (Holding) para su posterior evaluación morfológica. Finalizada la recuperación embrionaria, se realizó la sutura de los planos quirúrgicos y la administración de antibióticos (Penicilina benzatínica 22.000 UI/Kg IM y analgésicos Flemuxin Neglumine. 1.1 mg/Kg IM). Los animales fueron trasladados a corral especial de recuperación post operatoria donde fueron monitoreados; posterior a 8 días de recuperación se retiraron los puntos.

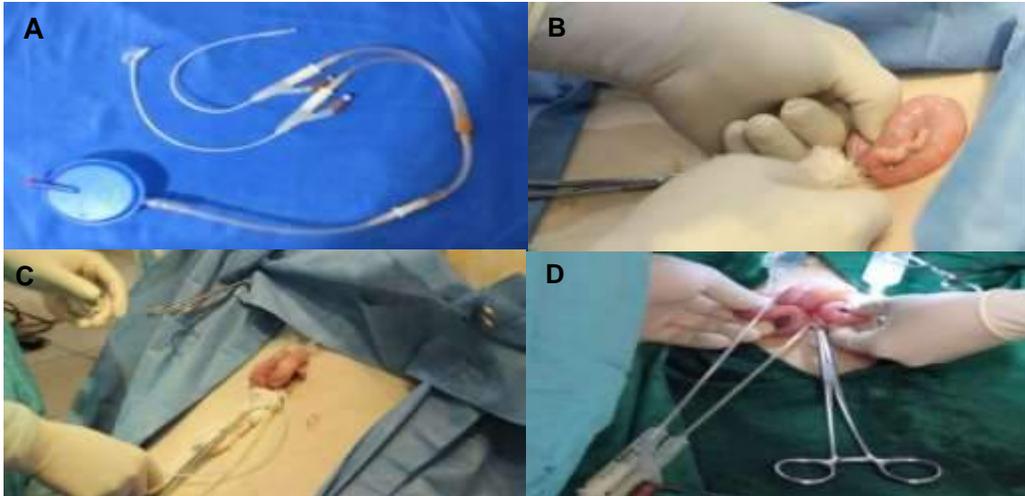


Figura 12. Proceso recuperación embriones. Equipo lavado **A** Sondas y filtros lavado **B** Colocación sonda cuerno uterino, **C** Colocación catéter luz cuerno uterino **D** Lavado embriones



Figura 13. Lavado uterino recuperación embriones; **A**, aplicación PBS; **B**, masaje uterino

3.5 Determinación de cantidad y calidad embrionaria

El procedimiento experimental se realizó mediante previa esterilización del material y posteriormente se realizaron tres observaciones de la caja Petri en zig-zag para la búsqueda de embriones y proceder a su clasificación bajo el estereoscopio a 40 X, sobre placa térmica a 38°C. El concepto de la calidad donde se evalúan y categorizan las estructuras de 1 a 4, siendo 1 un embrión excelente y 4 un embrión malo o degenerado; dada esta clasificación dependiendo de la formación de las células y su uniformidad y relación dentro del embrión, entre más haya células (blastómeros) sueltas y desorganizadas, menor será su calidad. Categorizan las estructuras de 1 a 4, siendo 1 un embrión excelente y 4 un embrión malo o degenerado; dada

esta clasificación dependiendo de la formación de las células y su uniformidad y relación dentro del embrión, a mayor número de células (blastómeros) sueltas y desorganizadas, menor será su calidad. Así mismo se desarrolló bajo los criterios de selección, mencionados en cada una de las fases de crecimiento celular de acuerdo con las pautas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow & Givens, 2010), donde se evalúa el estadio de desarrollo y la morfología e integridad figura 14 y figura 15



Figura 14. Búsqueda clasificación y evaluación calidad embrionaria



Figura 15. Embriones obtenidos donadoras trihíbridas de excelente y buena calidad.

Una vez reagrupados e identificados los embriones se procedió a clasificarlos y evaluarlos de acuerdo con las pautas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones que manifiesta que las etapas de desarrollo consideradas fueron las siguientes: 3 mórula temprana; 4 mórula; 5 blastocisto temprano y 6 blastocisto. Los códigos de calidad asignados fueron los siguientes:

- Excelente: masa embrionaria simétrica y esférica con blastómeros individuales uniformes en tamaño, color y densidad con al menos 85% del material celular intacto.
- Bueno: irregularidades moderadas en la forma general de la masa embrionaria en tamaño, color y densidad de células individuales con 26% a 84% del material celular intacto.
- Regular: irregularidades severas en la forma general de la masa embrionaria en tamaño, color y densidad con menos del 25% del material celular intacto.
- Malo: forma muy asimétrica, tendencia a la desintegración como granulación o vacuolización de los blastómeros. Incluye también a los estadios hasta 8 células y la clara degeneración. Esta categoría es considerada como no transferible (Stringfellow & Givens, 2010).

Solo se utilizaron para criopreservación los embriones categorizados como excelentes y buenos (códigos 1 y 2). Se recuperaron un total de 220 embriones (figura 16).

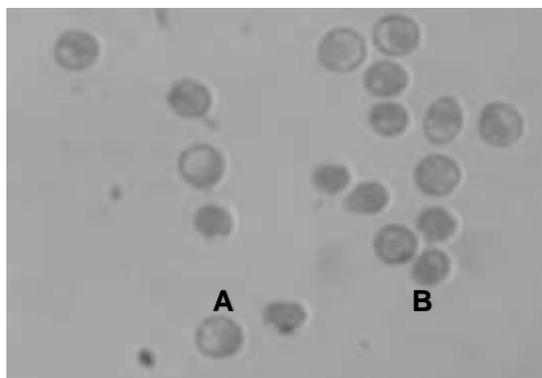


Figura 16. Evaluación calidad embrionaria embriones; **A** calidad excelente; **B**, calidad buena

3.6 Criopreservación de embriones:

Para este fin se utilizaron 220 embriones de calidad excelente y bueno dividiendo el total de embriones en dos tratamientos por empaques; para el primer grupo se utilizaron 110 embriones vitrificados en empaque abierto OpenPpulled-Straw (OPS) y el segundo tratamiento experimental con 110 embriones vitrificados con el método cerrado (pajillas de 0.25cc); la Figura

17 expone las diferencias visuales de los empaques de los tratamientos. Los embriones obtenidos de cada oveja fueron divididos equitativamente por etapa de desarrollo, aleatorizados por tipo de empaque y vitrificados (dos embriones por cada empaque) como se muestra en la figura 17 y figura 18.



Figura 17. Empaques tratamientos vitrificación; A, OPS B Pajilla 0,25 cc).



Figura 18. Insumos y materiales vitrificación y desvitrificación; **A**, Placas de Petri; **B**, Crio protectores; **C**, Medios soluciones; **D**, Empaques OPS pajillas 0,25cc y Contenedores).

3.6.1 Tratamiento Método OPS (open-pulled straw):

Se implementó la técnica reportada por (Green et al., 2009; Varago et al., 2014). Los embriones fueron lavados en la solución de mantenimiento (TCM 199 Hepes, SFB 20%) y se depositaron inicialmente por cinco minutos en una gota de 50 μ l de solución de equilibrio (SE) compuesta por PBS al 20%, sustituto de suero sintético (SSS), 7.5% de etilenglicol (EG), 7,5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente se pasaron a la solución de vitrificación (SV1), compuesta de PBS al 20% de SSS, 10% de EG, 10% de

DMSO y 0.5 M de sacarosa durante 1 minuto seguido de la solución de vitrificación (SV2), compuesta de PBS al 20% de SSS, 15% de EG, 15% de DMSO y 0.5 M de sacarosa por otro minuto; en cada uno de los pasos se realiza limpieza de la pipeta en medio PBS (Figura 19).

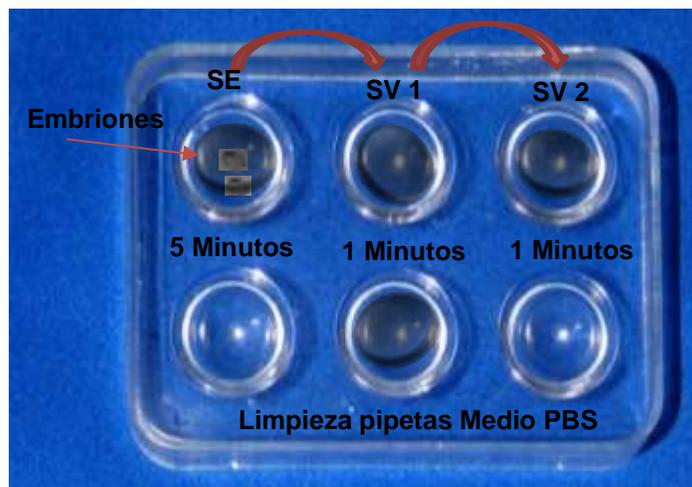


Figura 19. Esquematación de los Protocolos vitrificación con solución equilibrio (SE) solución vitrificación 1 (SV1) y solución vitrificación 2 (SV2).

Los procedimientos anteriormente expuestos, se realizaron en tiempos máximos de 60 segundos; posteriormente los embriones se ubicaron sobre el empaque OPS a través de una gota con un mínimo volumen (menores a $1\mu\text{l}$); el dispositivo de vitrificación se sumergió rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron en tanque de nitrógeno líquido hasta su calentamiento en conjunto con las pajillas (figura 20).



Figura 20. Procedimiento para realización de técnica vitrificación con OPS y Pajilla 0,25 cc.

3.6.2 Tratamiento Método Pajilla 0,25 CC:

Este tratamiento se realizó siguiendo las pautas establecidas por Kruse et al., (2012) con modificaciones al reemplazar la galactosa por sacarosa debido al beneficio reportado por (Merry, D. A., Bondioli, K. R., Allen, R. L., & Wright, 1984) con el fin de utilizar un menor volumen de llenado de solución de vitrificación y disminución del tiempo de enfriamiento de la pajilla en vapor de nitrógeno en un tiempo de 85 segundos.

Para calentar los embriones se utilizó solución de equilibrio (ES), y solución de vitrificación (VS), las mismas que se utilizaron en el tratamiento de OPS; posteriormente se siguieron las pautas establecidas por (Kuwayama et al., 2005); por cada caja de petri se colocó una gota de ES y cuatro gotas de VS de 20 μ l. Posteriormente, cada par de los embriones se colocó en la gota de ES con una duración de 5 minutos, transfiriendo 4 veces los embriones en las soluciones de VS durante 5, 5 y 10 segundos con lavado respectivo. Los embriones se ubicaron en la pajilla de 0.25 cc (figura 21) inmediatamente después de ser lavados en la última gota de VS, exponiéndose durante 30 segundos en vapor de nitrógeno líquido (N_2L) y sumergiéndose en el N_2L .

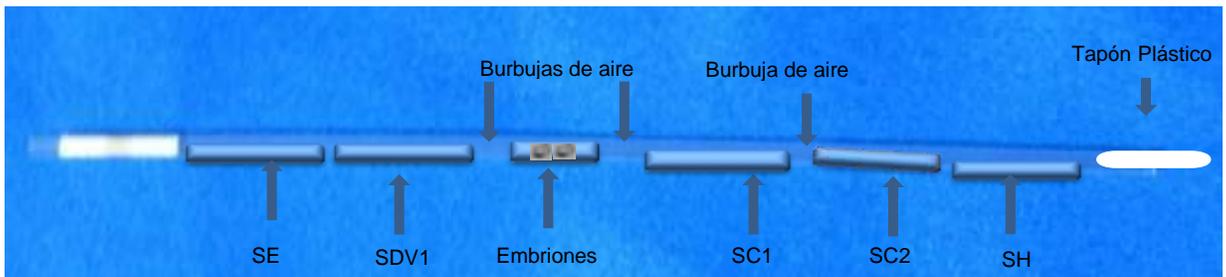


Figura 21. Método cerrado un paso vitrificación pajilla 0,25 cc. SE: Solución Equilibrio, SDV1: solución de vitrificación 1 SC1: Solución calentamiento 1, SC2: Solución calentamiento 2 SH: solución holding.

3.7 Calentamiento Embriones

3.7.1 Tratamiento Método OPS (open-pulled straw):

El calentamiento se realizó sumergiendo rápidamente la OPS en una placa de Petri con solución de calentamiento (SC) y sacarosa (0,5 M en medio M2) a 37°C durante 2 minutos. Posteriormente los embriones se colocaron en

gotas de 50 μ l de sacarosa y albúmina (0,25M en medio M2) por 2 minutos en solución de calentamiento 1 (SC1) y transitando a gotas de 50 μ l con medio M2 durante solución de calentamiento 2 (SC2) por 1 minuto, lavándose dos veces en dicho medio. Este procedimiento se describe en la Figura 22. Finalmente, los embriones fueron cultivados en medio de desarrollo TCM199 (20% SFB) en incubadora de 5% de CO₂ en aire a 38°C por 72 horas y se evaluó la tasa de eclosión post calentamiento como medida de supervivencia.

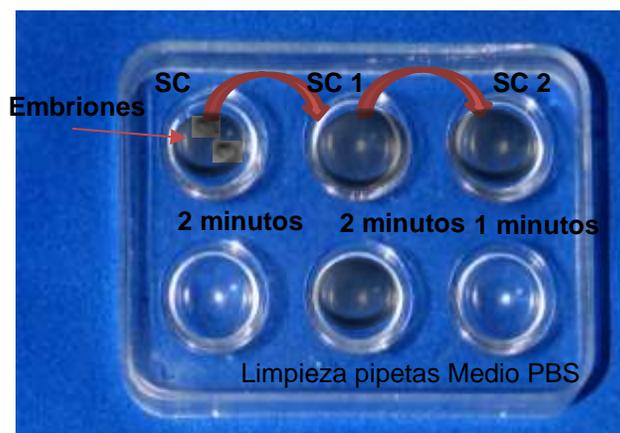


Figura 22. Esquemización de los protocolos calentamiento solución calentamiento (SC) solución calentamiento1 (SC1) solución calentamiento 2 (SC2).

3.7.2 Tratamiento Método Pajilla 0,25 cc:

Las pajillas vitrificadas se calentaron en aire a temperatura ambiente durante 8 segundos y posteriormente se sumergieron en agua a 37 °C por 20 segundos; asimismo, la pajilla se agitó (como termómetro clínico) para mezclar los embriones con solución de calentamiento, esta se dejó en reposo por 2 min e inmediatamente los embriones fueron cultivados para su posterior evaluación.

3.8 Evaluación viabilidad tratamientos vitrificación

3.8.1 Evaluación viabilidad tratamientos vitrificación *in vitro*

Los 160 embriones empacados de a dos embriones en cuarenta empaques por cada tratamiento depositaron en cajas de Petri para ser cultivados en incubadora de 5% de CO₂ en aire a 38°C por 72 horas, evaluando la tasa de expansión y eclosión. Se determinó el porcentaje de embriones expandidos y la tasa de eclosión a las 24, 48 y 72 horas post calentamiento esto se desarrolló en instalaciones laboratorio UPTC figura 23.



Figura 23. Laboratorio Genética Humana UPTC & Equipos cultivo embriones desvitrificados para evaluación viabilidad.

Se colocaron en cultivo 160 embriones calentados, n=80 embriones del método abierto OPS y n=80 embriones del sistema cerrado (Pajilla). Se obtuvo una viabilidad general del 70 % (112/160) en los estadios de desarrollo de evaluación expansión y eclosión a las 72 horas de cultivados. Los embriones vitrificados que sobrevivieron al proceso de criopreservación continuaron su desarrollo, expansión y aquellos que no sufrieron este proceso se oscurecieron, no se observaron cambios ni presentaron daños, como pérdida calidad post criopreservación y en algunos se generaron desprendimientos de células (figura 24).

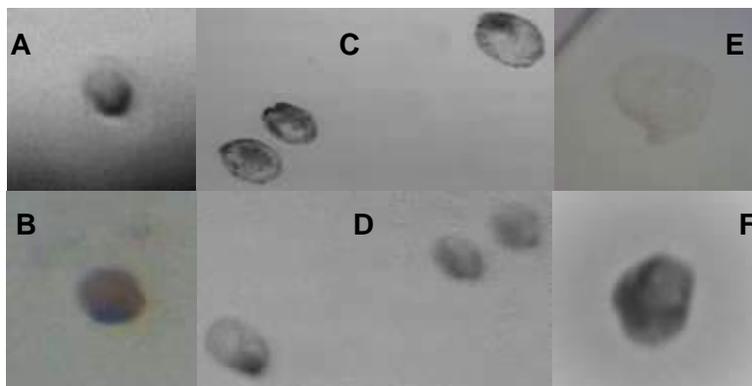


Figura 24. Evaluación *in vitro* embriones desvitrificados; **A**, Embriones desarrollo 24 horas OPS; **B**, Embriones desarrollo 24 horas en Pajilla. **C** Desarrollo cultivo crecimiento embrionario 48 horas OPS. **D** Desarrollo cultivo crecimiento embrionario 48 horas Pajilla **E** Embrión eclosionado. **F** Embrión muerto.

3.8.2 Evaluación viabilidad tratamientos vitrificación *in vivo*

Para evaluar la viabilidad de los embriones vitrificados se realizó el calentamiento y transferencia a 10 receptoras mestizas comerciales entre 17 y 24 meses de edad, en condición corporal de 3 entre 35 a 38 Kilogramos de peso vivo, reproductivamente sanas de un parto y pertenecientes al proyecto Ovino y en las instalaciones del aprisco de la Fundación Universitaria Juan de Castellanos. Se transfirieron los dos embriones por cada empaque a una oveja receptora. Estos fueron observados e inmediatamente transferidos. El diagnóstico de gestación se realizó por ecografía 45 a 55 días posterior a la transferencia de embriones, determinando la presencia o ausencia de preñez mediante observación placentomas o fetos. (Figura 25)



Figura 25. Receptoras Transferencia embriones calentados de la FUJDC

De los 220 embriones vitrificados se transfirieron a 10 receptoras cinco pares de embriones en empaque abierto (OPS) y 5 pares de embriones en empaque cerrado (Pajilla) fueron utilizados para la transferencia de embriones posterior a ser calentamiento de acuerdo a su empaque explicado anteriormente; inmediatamente después se depositaron en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo a los 6,5 días post inducción de la ovulación en la oveja receptora (Figura 26).



Figura 26. Transferencia embriones calentados a receptoras.



Figura 27. Diagnostico preñez ultrasonografía **A** Placentomas **B** Feto. PS) cerrado (Pajilla).



Figura 28. Receptoras crías embriones vitrificados OPS **A** y **B**. Pajilla 0,25cc **C**.

3.9 Análisis Datos

3.9.1 Análisis de datos Respuesta tratamientos superovulación

Los datos recolectados fueron organizados en hojas de cálculo en Microsoft Excel®, realizando análisis estadísticos descriptivos necesarios como:

- Análisis de distribución de frecuencias.
- Medidas de tendencia central (media, mediana y moda).
- Medidas de dispersión (rango y desviación estándar).

La distribución de frecuencias permitió agrupar características encontradas en los grupos de ovinos estudiado; las medidas de tendencia central y dispersión se calcularon con base en el número de cuerpos lúteos detectados por sujeto de estudio para cada método de (ultrasonografía, laparoscopia y laparotomía). Para la comparación de los resultados obtenidos con la ultrasonografía, laparotomía y laparoscopia se realizó un análisis de varianza (ANOVA), utilizando un análisis del modelo con efectos fijos donde los parámetros del modelo son cantidades fijas o no aleatorias y los efectos están correlacionados con las variables independientes; para esto se realizó una suma de cuadrado de las diferencias de las observaciones dentro de los tratamientos (tipos de evaluaciones de cuerpos lúteos) y sus promedios, formulando y probando las hipótesis sobre los principales efectos e interacciones. Posteriormente se estableció la relación entre la variabilidad explicada por el experimento y la variabilidad no explicada o error, mediante una prueba F. Por lo tanto, para el rechazo de la hipótesis nula y diferencia entre las medias de los tratamientos se debe cumplir que:

$$F_o > F_{\alpha, a-1, N-a}$$

Asimismo, se utilizaron medidas de concordancia. La concordancia es el grado en que dos o más observadores, métodos, técnicas u observaciones están de acuerdo sobre el mismo fenómeno observado (Cortés-Reyes et al., 2010) Para identificar el grado de concordancia o acuerdo entre los dos

métodos se utilizó el Coeficiente de Correlación Concordancia (CCC) de Lin usando el programa Microsoft Excel® de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$CCC < -1 = \text{perfecta discordancia}$$

$$CCC > +1 = \text{concordancia perfecta}$$

El CCC adquiere valores entre -1 (perfecta discordancia) a +1 (concordancia perfecta).

Dado que la información resultante no se ajustó al supuesto de normalidad, la cual fue verificada en el programa Past 2.12 con la prueba de Shapiro-Wilk, se calculó el coeficiente de concordancia W de Kendall, para obtener la significancia estadística del grado de correlación entre los métodos (Ultrasonografía Laparoscopia y laparotomía). El margen de error para las pruebas estadísticas fue del 5% ($\alpha=0,05$).

3.10 Resultados

3.10.1 Características de la muestra

La muestra estaba conformada por 25 hembras ovinas adultas a las cuales se les evaluó la condición corporal (CC), correspondiente a la medición subjetiva del estado físico nutricional de los animales mediante la escala de 1 a 5, donde 1 corresponde a animales con muy bajo peso y estado de carnes y 5 corresponde a un animal obeso o demasiado gordo, la condición ideal para su desempeño reproductivo se considera 3. (Abecia et al., 2015) En la muestra de ovejas conformada por 25 hembras se trabajaron 13 hembras primíparas con edad promedio 19,3 meses con un rango de 18 a 23 meses y con una desviación estándar de 1,60 y 12 hembras múltiparas con edad promedio de 44 meses con un rango de 24 a 74 meses y con una desviación estándar de 18,06 a nivel general el promedio de 31,2 meses (2,6 años) y desviación estándar general de la edad de 17.58; la condición corporal más frecuente fue 4 con el 64% (n= 25) (Figura 29).

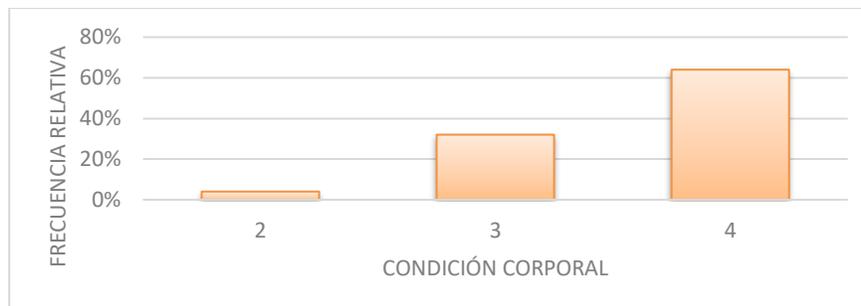


Figura 29. Distribución porcentual de la muestra analizada según la condición corporal de los animales.

El peso promedio de los individuos fue de 37,6 Kg, en un rango comprendido entre 28 y 45 Kg, con peso promedio de 37,6 Kg y 4,27 de desviación estándar, el 80% de las ovejas tuvo pesos por encima de los 35 Kg como se observa en la Figura 30.

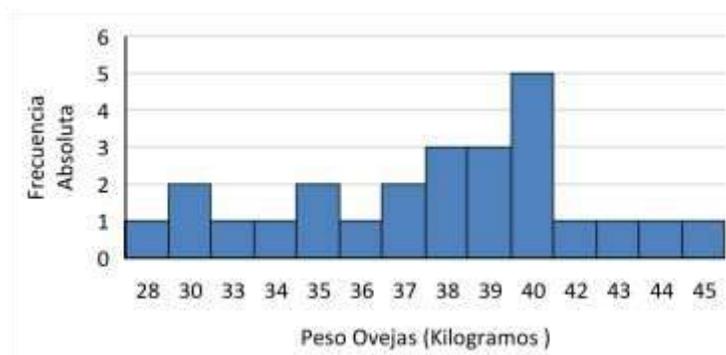


Figura 30. Histograma de distribución de frecuencia absoluta para el peso en kg de las ovejas en la muestra analizada

En la muestra de ovejas conformada por 25 hembras se trabajaron 13 hembras primíparas (52%) con edad promedio 19,3 meses con un rango de 18 a 23 meses y con una desviación estándar de 1,60 y 12 hembras múltiparas (48%) con edad promedio de 44 meses con un rango de 24 a 74 meses y con una desviación estándar de 18,06 a nivel general el promedio de 31,2 meses (2,6 años) y desviación estándar general de la edad de 17,58 meses (figura 31).

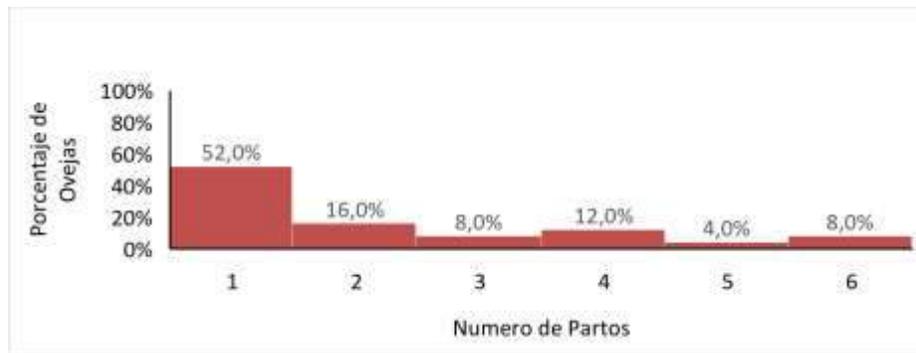


Figura 31. Distribución porcentual de las hembras en la muestra según el número de partos presentados al momento del tratamiento.

3.10.2 Conteo de cuerpos lúteos

El conteo de cuerpos lúteos se muestra en la tabla 7. Utilizando la técnica de ultrasonografía (US) se detectaron 193 y 183 cuerpos lúteos en los ovarios derecho e izquierdo respectivamente. El número de cuerpos lúteos observados por ovario varió entre 4 y 15 con un promedio de 7,5 y moda de 5 para el ovario izquierdo y 6 para ovario derecho. Con la técnica de laparoscopia (LPS) se observa un número menor de cuerpos lúteos, 182 en el ovario derecho y 168 en el ovario izquierdo en comparación con la ultrasonografía y el tratamiento control para las dos técnicas es laparotomía LPT (211 ovario derecho y 199 ovario izquierdo). La eficiencia del diagnóstico ecográfico (DE) en la detección de cuerpos lúteos se evaluó mediante comparación con el número observado en los procedimientos de LPS y LPT. Dadas las dificultades en la observación directa mediante equipos de ultrasonografía y de laparoscopia al interior del animal se observa una cantidad menor de CL en los ovarios, con relación a técnica de laparotomía.

Tabla 7. Número de cuerpos lúteos detectados mediante diferentes técnicas en ovejas sometidas a tratamiento de superovulación.

	Ultrasonografía			Laparoscopia			Laparotomía		
	OD**	OI***	Total CL	OD	OI	Total CL	OD	OI	Total CL
CL* Observados	193	183	376	182	168	350	211	199	410
Promedio	7,7	7,3	15	7,3	6,7	14	8,4	8	16,4
Mínimo	4	3	8	2	0	4	2	2	4
Máximo	15	15	27	12	15	26	15	18	30
Desviación Estándar	2,9	3,4	5,8	2,8	3,7	6	3,5	4,1	6,9

*CL: Cuerpos Lúteos **OD: Ovario derecho ***OI: Ovario izquierdo

3.10.3 Análisis de Varianza entre las diferentes técnicas de conteo de cuerpos lúteos.

Con el fin de establecer la existencia de variaciones en la implementación de las técnicas de ultrasonografía y laparotomía para el conteo de cuerpos lúteos, se utilizó un diseño factorial de un solo factor, planteando un modelo de efectos fijos con valor $p < 0,05$, estableciendo la aceptación de la hipótesis nula si la variación de los tratamientos no es significativa. El valor F calculado para la evaluación de cuerpos lúteos por técnicas de ultrasonografía y laparotomía del ovario izquierdo fue de 0,36 y de 0,6 para el ovario derecho. Igualmente, los resultados obtenidos al evaluar las técnicas de laparoscopia y laparotomía se obtuvo un valor F de 1,67 en el ovario derecho y 1,26 en el ovario izquierdo. Al realizar la comparación con el valor de distribución F correspondiente a 4,04 los valores calculados son menores; por lo tanto, se acepta la hipótesis nula, de que las técnicas de ultrasonografía y laparoscopia no varían o no afectan la estimación de cuerpos lúteos.

Al comparar las tres técnicas (ultrasonografía, laparoscopia y laparotomía) con la totalidad de cuerpos lúteos por oveja (ovarios derecho e izquierdo) en las mismas condiciones, el valor calculado de F es 0,92 y el valor de distribución F fue de 3,12; por lo tanto, se concluye que las técnicas de

ultrasonografía, laparoscopia y laparotomía no varían o no afectan la estimación de cuerpos lúteos.

3.10.4 Concordancia entre las técnicas de ultrasonografía y laparotomía para el conteo de cuerpos lúteos

Para evaluar la correlación o concordancia entre las dos técnicas se verificó, en primer lugar, el supuesto de normalidad usando el test de Shapiro-Wilk. En este estudio el conjunto de datos no se ajusta a una distribución normal (Ovario derecho - ultrasonografía, $p=0,02$, laparotomía, $p=0,56$. Ovario izquierdo - ultrasonografía, $p=0,004$, laparotomía, $p=0,0014$). Por esta razón la medida de concordancia empleada fue el coeficiente W de Kendall, cuyo resultado para ovario derecho fue $W=0,95$ y $p=0,0047$, y en ovario izquierdo $W=0,90$ y $p=0,009$ (Figura 32 y Figura 33).

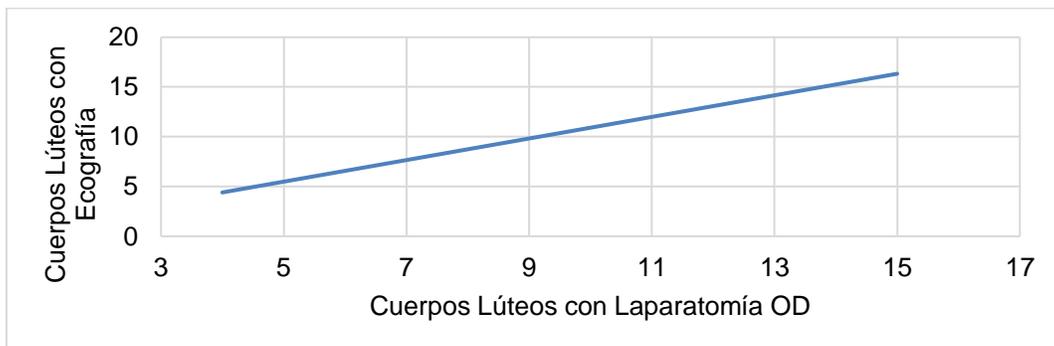


Figura 32. Gráfico de dispersión que muestra la relación entre el número de cuerpos lúteos detectados por ultrasonografía y laparotomía en el ovario derecho de las ovejas en la muestra

Utilizando el coeficiente de correlación de Spearman (no paramétrica), se obtuvo una tendencia similar, obteniendo un valor de Rho de Spearman cercanos a 1 (0,90 en ovario derecho y 0,80 en izquierdo), lo cual indica una correlación positiva fuerte entre el número de cuerpos lúteos detectado con las dos técnicas (Ortega et al., 2009).

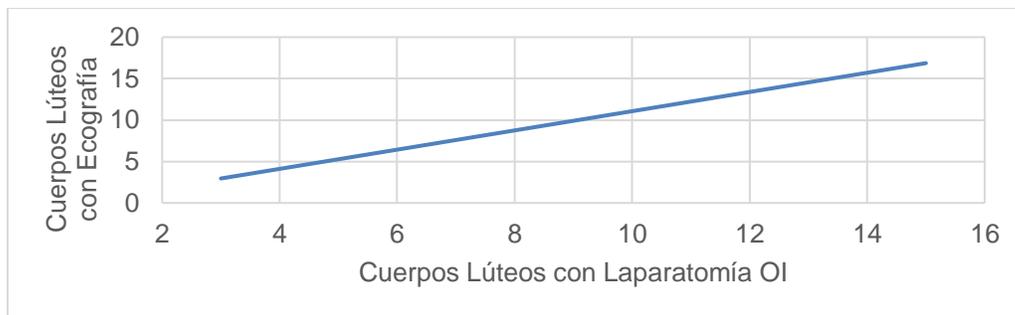


Figura 33. Gráfico de dispersión que muestra la relación entre el número de cuerpos lúteos detectados por ultrasonografía y laparotomía en el ovario izquierdo de las ovejas en la muestra.

Además, en ambos casos el valor de p fue menor a 0,05, mostrando que dicha correlación fue estadísticamente significativa. En algunos casos hay coincidencia perfecta entre los cuerpos lúteos encontrados con ultrasonografía y con laparotomía.

3.10.5 Concordancia entre las técnicas de laparoscopia y laparotomía para el conteo de cuerpos lúteos

Para evaluar la correlación o concordancia entre las dos técnicas se verificó el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk, cuyo resultado indicó que uno de los conjuntos de datos no se ajustaba a una distribución normal (Ovario derecho - laparoscopia, $p=0,39$; laparotomía, $p=0,56$. Ovario izquierdo – laparoscopia, $p=0,07$; laparotomía, $p=0,001$); por consiguiente la medida de concordancia empleada fue el coeficiente W de Kendall, cuyo resultado para ovario derecho fue $W=0,96$ y $p=0,0039$, y en ovario izquierdo $W=0,93$ y $p=0,0063$ (Figura 34, Figura 35 y Tabla 8).

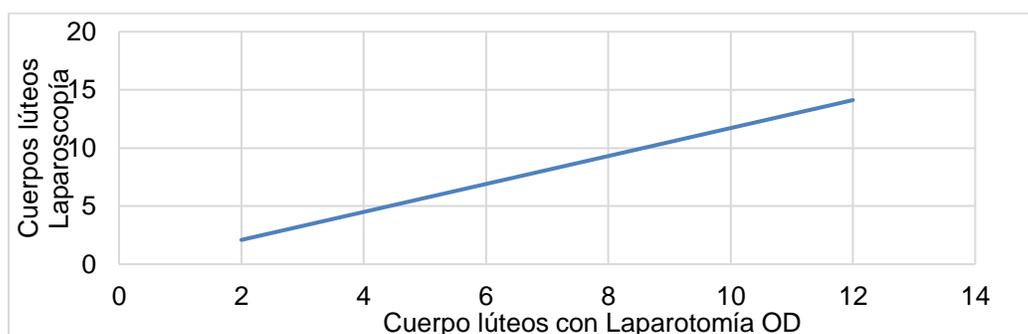


Figura 34. Gráfico de dispersión que muestra la relación entre el número de cuerpos lúteos detectados por laparoscopia y laparotomía en el ovario derecho de las ovejas en la muestra. Rho De Spearman=0,93677, W De Kendall= 0,9684

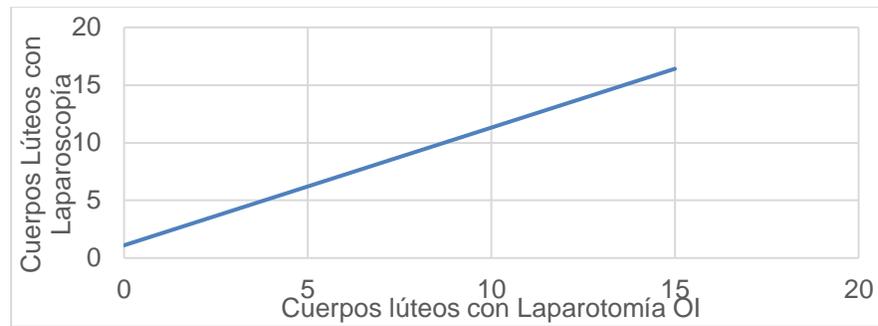


Figura 35. Gráfico de dispersión que muestra la relación entre el número de cuerpos lúteos detectados por laparoscopia y laparotomía en el ovario izquierdo de las ovejas en la muestra. Rho de Spearman=0,86225, W de Kendall=0,9311

En la tabla 8 se muestra la concordancia entre las técnicas de ultrasonografía, laparoscopia y laparotomía para el conteo de cuerpos lúteos mediante el coeficiente de concordancia de Kendall, y el coeficiente rho de Spearman, interpretándose los dos de la misma manera, es decir, indicando el grado y tipo de asociación que existe entre las variables; se deben tomar en cuenta para realizar el análisis, las siguientes condiciones: si la concordancia resulta de entre 0 y 1, excluyendo al 0, significa que existe una concordancia directamente proporcional entre las dos variables, es decir, el aumento de una de las variables indica el aumento de la otra: Si la relación da -1 o 1 significa que existe una concordancia perfecta; cuando la concordancia se encuentra entre 0 y 0,3 podemos hablar de que existe una concordancia baja; mientras que cuando da entre 0,4 y 0,6 esta es una concordancia media; y cuando da entre 0,7 y 1 indica que la concordancia es alta.

De acuerdo con los datos obtenidos podemos determinar que la concordancia entre las técnicas ultrasonografía y laparotomía al estar en rango mayor a 0,75 indica que es alta y directamente proporcional, es decir, el aumento de una técnica corresponde al aumento de la otra y viceversa, al igual que en laparoscopia y laparotomía. También al ser el valor $p < 0.05$ en todos los resultados se concluye que es estadísticamente significativo.

Tabla 8

Tabla 8. Concordancia entre las técnicas de ultrasonografía, laparoscopia y laparotomía para el conteo de cuerpos lúteos.

	Ultrasonografía/Laparotomía		Laparoscopia/Laparotomía	
	rho-Spearman	Valor p	rho-Spearman	Valor P
Ovario Derecho	0,90913	3,20E-10	0,93677	5,68E-12
W de Kendall	0,9546	0,0047	0,9684	0,0039
Ovario Izquierdo	0,80708	1,09E-06	0,86225	3,02E-08
W de Kendall	0,9035	0,009	0,9311	0,0063

3.10.6 Cantidad de embriones recuperados

De las 24 ovejas en estudio se recuperaron 222 embriones mediante lavado uterino, recuperados con una variación de 1 hasta 16 embriones por oveja, para un promedio general de $9,3 \pm 4,0$ embriones. De los 222 embriones, 105 del primer grupo de ovinos de un solo parto y 117 embriones del grupo II (múltiparas). En el grupo I en promedio 8,75 embriones por oveja (rango 1 - 15) con una desviación estándar de 4,07 embriones y el grupo II en promedio 9,75 embriones por oveja (rango 4 - 16) con una desviación estándar de 3,96 embriones respectivamente, correspondiendo a un 53% en ovejas múltiparas, y 47% para el grupo de primíparas. Al diferenciar la cantidad de ovinos con uno, dos, tres, cuatro y seis partos, la mayor cantidad de embriones por número de parto se obtuvo en ovejas primíparas, debido a que hay un mayor número de animales en esta condición (Figura 36).

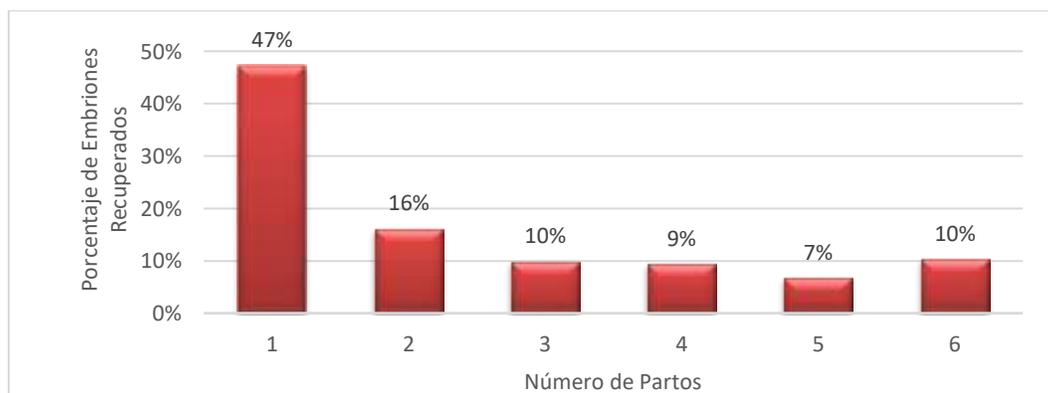


Figura 36. Distribución porcentual de los embriones recuperados según número de partos

La tasa de recuperación la cual se obtiene de acuerdo con el número embriones obtenidos respecto al número de cuerpos lúteos observados en cada una de las donadoras fue de 58% en promedio y una desviación estándar de $\pm 20\%$, en ovejas primíparas, el porcentaje de recuperación fue de 56% con una desviación estándar de $\pm 24\%$ y el grupo de ovejas multíparas, la tasa de recuperación fue de 59% con una desviación estándar $\pm 14\%$, Tabla 9 donde la tasa más baja correspondió a hembras de 6 partos con un 54% y la más alta de 71 % a hembras de 5 partos (Figura 37).

Tabla 9. Tasa de recuperación de embriones de acuerdo a número de partos.

Número de partos	n	Recuperación embriones		Desviación estándar	Tasa recuperación	Desviación estándar
		Número	Promedio			
Primípara	12	105	8,75	4,07	56%	0,24
Multípara	12	117	9,75	3,95	59%	0,14

Asimismo, utilizando intervalos de confianza derivados de la distribución t de Student y comparando el grupo 1 y el grupo 2, se obtuvo una variación de $\pm 15,3\%$ en ovejas primíparas y $\pm 9,23$ en multíparas; lo anterior evidencia una mayor variabilidad de la recuperación en ovejas con un solo parto.

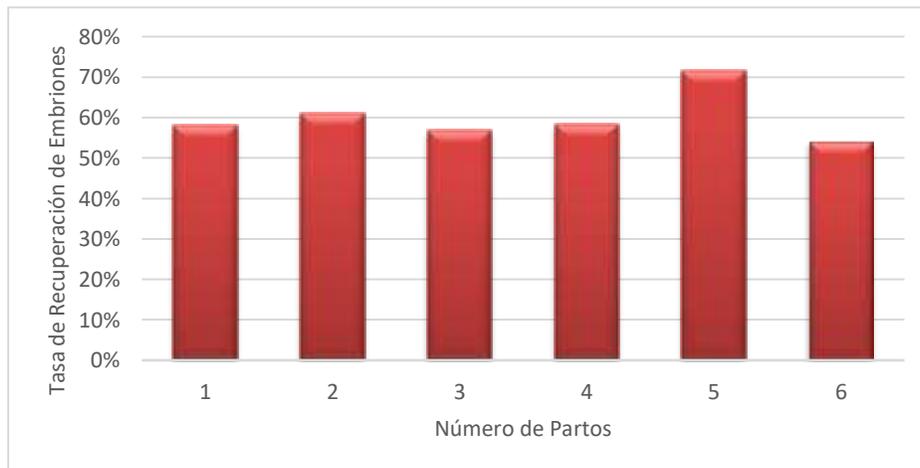


Figura 37. Tasa recuperación embriones según número de partos.

Estadísticamente, las tasas de recuperación de embriones fueron similares para los dos grupos ($p > 0.05$); por lo tanto, no hubo diferencias significativas en el efecto del número de partos en la recuperación embrionaria.

3.10.7 Relación entre el número de partos y el número de embriones recuperados

Esta Concordancia se realizó mediante el coeficiente de Concordancia no paramétrico de Spearman, generando un valor de Concordancia 0,03 y $p=0,89$, reflejando la inexistencia de asociación o Concordancia estadísticamente significativa entre las dos variables, en consecuencia, es factible afirmar que el número de embriones recuperados es independiente al número de partos. En ovejas que presentaban una condición corporal 3 se obtuvo una recuperación de $8,88 \pm 3.9$ embriones cuyo rango de recuperación fue (1 embrión a 14 embriones por oveja). En el grupo de ovejas con condición corporal 4 se obtuvo un promedio de $9,4 \pm 4,1$ embriones recuperados por oveja (rango 2 -16 embriones por oveja; figura 38).



Figura 38. Condiciones corporales y número de embriones recuperados

En cuanto la tasa de recuperación de embriones en ovejas con condición corporal 3 y 4 en promedio fue de $49,0\% \pm 14,9$ y $62\% \pm 0,21$ respectivamente se conformaron intervalos de confianza de $\pm 12,4\%$ y $\pm 10,9\%$ respectivamente; la figura 39 expone estas diferencias.



Figura 39. Tasa recuperación embriones según condiciones corporales.

La Tabla 10 muestra que la tasa de recuperación de acuerdo con las condiciones corporales la mejor recuperación se obtuvo con la condición corporal 4 con un $62\% \pm 0,21$; y promedio de $9,4 \pm 4,1$ y para la condición corporal 3 la tasa de recuperación fue de $49\% \pm 0,15$; el promedio fue de $8,9 \pm 3,9$. La máxima tasa de recuperación de embriones se generó con la condición corporal 4 que fue de 100% y también la mínima con 22% y en la condición corporal 3 se obtuvo como tasa mínima 25 % y 71% la máxima.

Tabla 10. Tasa de recuperación de embriones de acuerdo con la condición corporal.

C.C.	n	Recuperación embriones		Desviación estándar	Tasa recuperación	Desviación estándar
		Numero	Promedio			
3	8	71	8,9	3,87	49%	0,15
4	16	151	9,4	4,11	62%	0,21

3.10.8 Relación entre la condición corporal y el número de embriones recuperados

La relación entre la condición corporal y el número de embriones recuperados mostró un valor de Concordancia 0,03 y $p= 0,89$, reflejando escasa relación entre las variables; por lo tanto, no existe asociación o Concordancia estadísticamente significativa entre las dos variables. en consecuencia, es factible afirmar que el número de embriones a recuperar es independiente de la condición corporal.

Distribución de las etapas de desarrollo embrionario

El total de los 222 embriones recuperados en la tabla 11 se caracterizan de acuerdo con el estadio de desarrollo de los mismos (Figura 40). Como se observa el mayor porcentaje de embriones recuperados correspondió a mórulas compactas 42 % seguido de mórulas tempranas con 30 %, Blastocistos 22% y un 6% de blastocistos eclosionados.

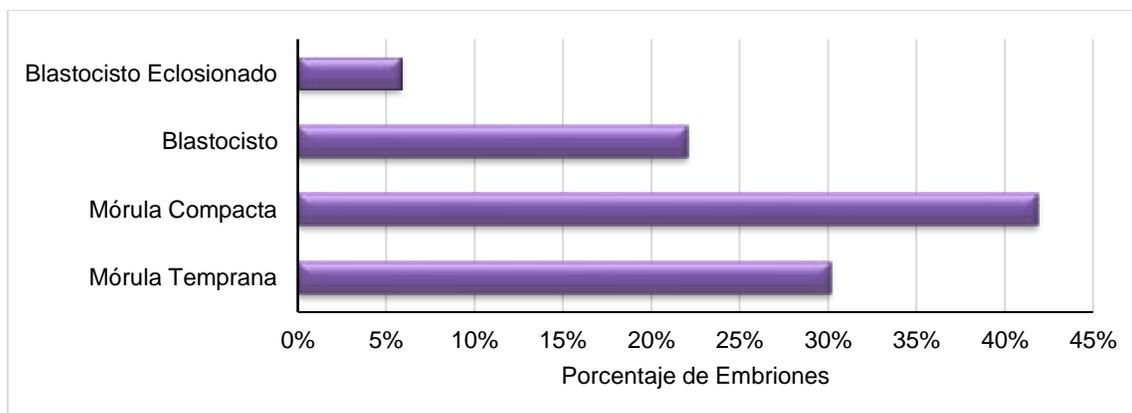


Figura 40. Distribución porcentual de los 222 embriones recuperados según el estadio de desarrollo alcanzado.

Relación Entre Número de partos y Estadios de Desarrollo Embrionario

La clasificación de los estadios de desarrollo recuperados según el número de partos refleja que, en ambos grupos, la condición de embriones obtenidos se encontraba con mayor frecuencia en estado de mórulas temprana y compacta; la tabla 11 expone estas diferencias.

Tabla 11. Estadios de desarrollo recuperados de acuerdo número de partos.

Estadios de Desarrollo	Primípara n:12		Multípara n:12		TOTAL, n:24	
	Mórula temprana	34	15,3%	33	14,9%	67
Mórula compacta	42	18,9%	51	23,0%	93	42%
Blastocisto	19	8,6%	30	13,5%	49	22%
Blastocisto eclosionado	10	4,5%	3	1,4%	13	6%
Total	105	47,3%	117	52,7%	222	100%

Para el grupo I (primíparas), se recuperaron 18.9% de embriones en etapa mórula compacta mientras que para el grupo II (multíparas) se recuperaron 51 embriones en estado de mórula compacta correspondiente al 23%; asimismo, en ambos grupos se obtuvo un bajo porcentaje de blastocitos eclosionados correspondiente a un 4,5% para el grupo I de primípara y 1.4% para el grupo II (figura 41).

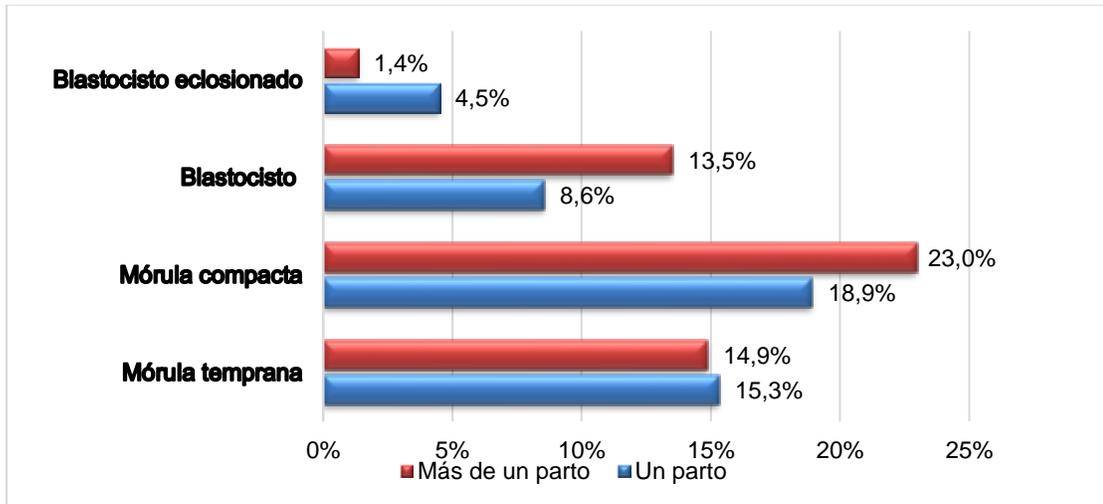


Figura 41. Distribución porcentual de los embriones recuperados según el estado de desarrollo alcanzado y número de partos.

Condición corporal y estadios de desarrollo embrionario.

En cuanto a la condición corporal y estadio desarrollo embrionario se obtuvo un mayor porcentaje en la condición cuatro que en la tres como se aprecia en tabla 12 y figura 42.

Tabla 12. Estadios de desarrollo recuperados de acuerdo a la condición corporal.

Estadios de desarrollo	CC, 3 n:8		CC, 4 n:16		TOTAL, n:24	
	n	%	n	%	n	%
Mórula temprana	10	4,5%	57	25,7%	67	30%
Mórula compacta	37	16,7%	56	25,2%	93	42%
Blastocisto	21	9,5%	28	12,6%	49	22%
Blastocisto eclosionado	3	1,4%	10	4,5%	13	6%
Total	71	32,0%	151	68,0%	222	100%

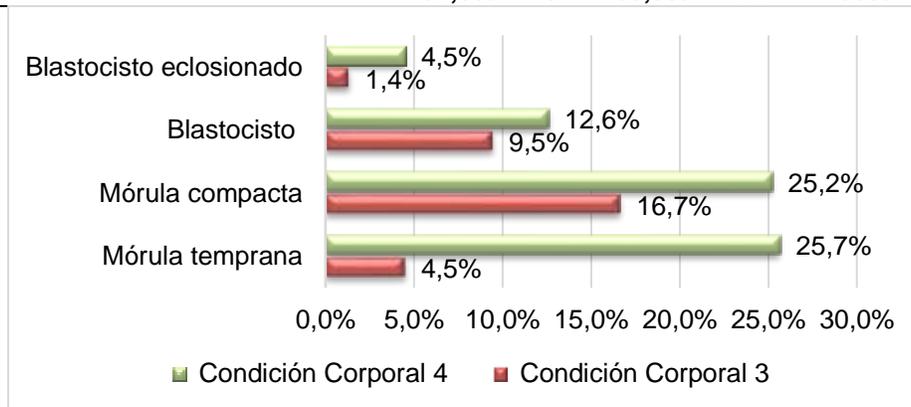


Figura 42. Distribución porcentual de los embriones recuperados según el estado de desarrollo alcanzado y condición corporal.

3.10.9 Calidad embrionaria

La calidad embrionaria fue evaluada de acuerdo con las pautas de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (Stringfellow y Givens, 2010). Se categorizaron entre regular (C), buena (B) y excelente (A), obteniendo promedios de los embriones recuperados de calidad regular $10 \pm 1,41$; calidad buena de $55 \pm 5,65$ y calidad excelente $46 \pm 4,24$ con los porcentajes del 9%, 50% y 41% respectivamente (Tabla 13). El 19% de embriones recuperados en el grupo de ovejas con un solo parto y 22% del grupo de ovejas con mayor a un parto se consideraron excelentes; respectivamente el 50% y 51% del total de embriones se consideraron buenos y un pequeño valor correspondiente al 5% y 4,1% de embriones se consideraron regular; con base en lo anterior, los métodos y calidad de extracción utilizados generaron un resultado positivo en relación con la cantidad y cantidad de embriones utilizados.

Tabla 13. Cantidad total y porcentaje (%) de embriones recolectados según grados de calidad y número de partos

Grupo	Regular		Buena		Excelente		Total	%
	Total	%	Total	%	Total	%		
Primípara	11	5,0%	51	23%	43	19%	105	47%
Múltipara	9	4,1%	59	27%	49	22%	117	53%
Total	20	9,0%	110	50%	92	41%	222	100%

Relación entre la calidad embrionaria recuperada y el número de partos

Al relacionar la calidad de los embriones recuperados con el número de partos de cada ovino previa a la presente investigación, la Concordancia de Spearman expuso una relación débil de 0,04 con un valor p de significancia estadística de 0,58, lo que indica que no se encontró una relación estadísticamente significativa entre el número de partos y la calidad embrionaria (figura 43).

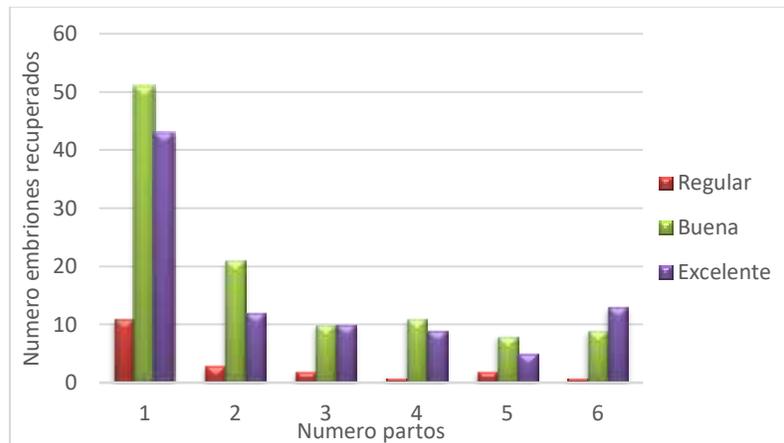


Figura 43. Número de partos calidad embriones recuperados.

Relación entre la calidad embrionaria recuperada y la condición corporal: La relación entre la calidad de los embriones recuperados con la condición corporal en la presente investigación, en cuanto a la calidad y cantidad de embriones recuperados fue mejor en la condición corporal 4 donde se obtuvieron un 29,7% de embriones calidad excelente y 32% buena y regular 6,3% de un total de 151 embriones; para el caso de la condición corporal 3 la calidad excelente es de 11,7%, calidad buena 17,6% y la calidad regular 2,7% como se aprecia en la tabla 14 y la figura 44.

Tabla 14. Cantidad total y porcentaje de embriones recolectados grados de calidad y la condición corporal.

Condición corporal	REGULAR		BUENA		EXCELENTE		Total %	
	Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
3	6	2,7%	39	17,6%	26	11,7%	71	32%
4	14	6,3%	71	32,0%	66	29,7%	151	68%
Total	20	9,0%	110	49,5%	92	41,4%	222	100%

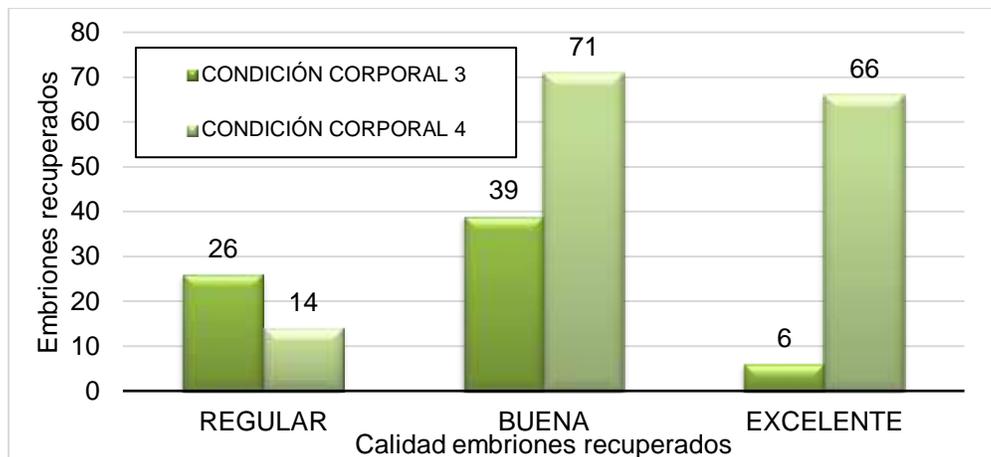


Figura 44. Condición corporal calidad embriones recuperados

Existe una Concordancia media debido a que el valor del coeficiente de Concordancia del rango de Kendall se encuentra entre 0,4 y 0,6 donde todos los casos de este estudio, la calidad en número de partos es de 0,049 y calidad la condición corporal es de 0,052 como se evidencia en Tabla 15; afirmando que existe una relación entre la calidad embrionaria y la condición corporal, en especial la condición corporal 4 donde se obtuvieron los mejores resultados de calidad embrionaria.

Tabla 15. Calidad embrionaria vs número de partos y condición corporal.

	Calidad Vs. Número de partos	Calidad Vs. Condición corporal
TAU B KENDALL	0,049477	0,051943
P – Valor	0,27259	0,24939

3.10.10 Comparación de viabilidad embrionaria de dos sistemas de empaque para vitrificación.

Los embriones vitrificados que sobrevivieron al proceso de criopreservación continuaron su desarrollo, expansión y aquellos que no sufrieron este proceso se oscurecieron, no se observaron cambios ni presentaron daños, como pérdida calidad post criopreservación y en algunos se generaron desprendimientos de células muestra la eficiencia de la vitrificación por cada sistema de empaque a las 72 horas de cultivo *in vitro*. Para el caso OPS se obtuvo una viabilidad del 72.5 % (58/80) y para el sistema cerrado o pajilla

la viabilidad fue del 67,6 % (54/80). No se encontraron diferencias estadísticas entre los dos procesos de empaquetamiento.

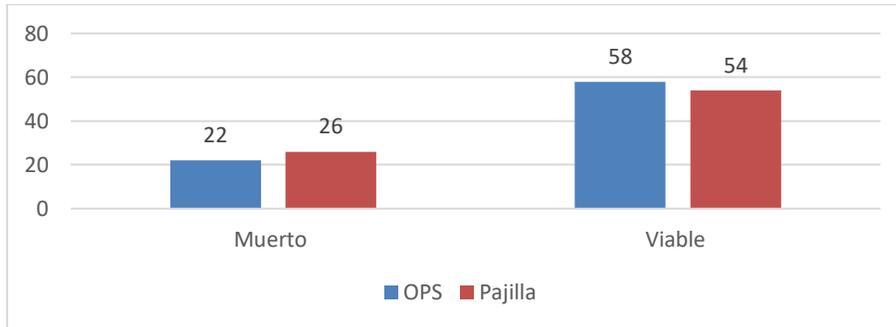


Figura 45. Porcentaje viabilidad tratamientos vitrificación abierto (OPS) y cerrado (Pajilla) a las 72 horas

En el tratamiento cerrado (Pajilla) de los 80 embriones cultivados a las 24 horas, 30 no sufrieron procesos de re expansión equivalentes al 38 %, 19 de estos se re-expandieron aportando un 24% y 5 eclosionan aportando un el 6 %; el porcentaje global de estadios de desarrollo en los dos tratamientos se observa en la Figura 45; paralelamente 26 embriones se catalogaron como muertos o no viables lo cual equivalen al 32.5%. Asimismo, en la observación de 24 horas de los embriones del tratamiento abierto (OPS) se observaron 27 no Re-expandidos (34%), 22 Re-expandidos (28%) eclosionados 10 (13%) y 21 embriones muertos (26.3%).

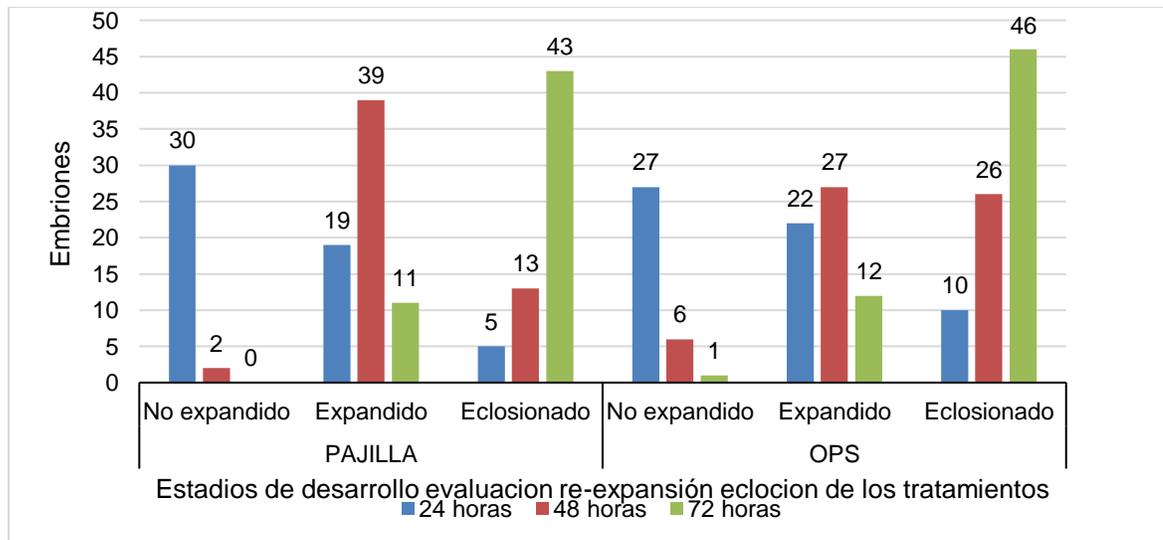


Figura 46. Estadios de desarrollo evaluación re-expansión eclosión de los tratamientos embriones vitrificación abierto (OPS) y cerrado (Pajilla) a las 24, 48 y 72 horas.

El tratamiento no afectó los procesos de desarrollo *in vitro*; mediante el ANOVA, utilizando un α de 0,05, donde $F > F_0$ en todos los estadios; es decir, la utilización de OPS o pajilla 25 cc no afectaría la supervivencia embrionaria, pudiendo lograr gestaciones de embriones vitrificados en cualquiera de estos sistemas permitiendo establecer la facilidad de aplicación en campo. Estos resultados se exponen en Tabla 16.

Tabla 16. Análisis de varianza entre empaques abierto y cerrado analizando porcentajes de estadios desarrollo *in vitro*

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados			F ₀		F	
		No expandido	Expansión	Eclosión	No expandido	Expansión		Eclosión
Tratamiento	1	0.67	73.5	28.167	0.0028	0.12	0.05	7.7
Error	4	2441.5	2270.83	2270.83				
Total	5	944	2515	2299				

3.10.11 Viabilidad posterior tratamiento de vitrificación cerrada (pajilla) y abierta (OPS)

Se determinó la viabilidad de los embriones mediante su desarrollo por medio de cultivo *in vitro* y evaluando la viabilidad a las 72 horas, observándose que la mayoría de los embriones 70% n=160 mostraron un buen comportamiento, continuando su viabilidad mediante la expansión o eclosión; la viabilidad puede observarse en las primeras horas post calentamiento donde al conservar dichas condiciones se mantienen los embriones continuara su desarrollo embrionario. Al ser mayor a 0,05 indica que no existe dependencia o asociación entre la variable (supervivencia) y el factor (empaque). La supervivencia de los embriones es independiente del método de vitrificación.

Tabla 17. Resultado prueba chi cuadrado tratamiento vitrificación empaque abierto (OPS) Y Cerrado (Pajilla) a las 72 horas.

CHI CUADRADO Muerto vs. Viable	
N1:	48
N2:	112
Grado libertad:	1
Chi cuadrado:	0,47619048
P :	0,49015296*

3.10.12 Evaluación de viabilidad *in vivo*

Se obtuvo para el tratamiento abierto (OPS) un 40% (2/5) de preñez y un 20% (1/5) para tratamiento cerrado (Pajilla). Figura 47

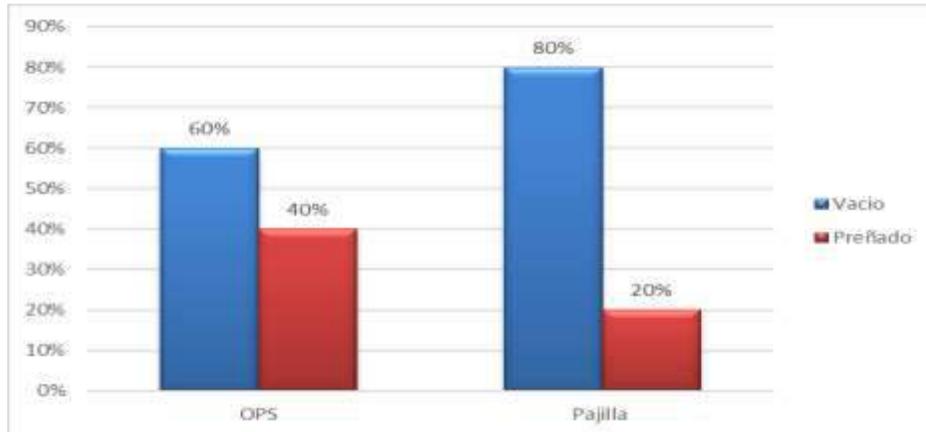


Figura 47. Porcentaje preñez embriones transferidos tratamientos vitrificación abierto

3.11 Discusión

3.11.1 Uso ultrasonografía transrectal y laparoscopia con la laparotomía, en el diagnóstico de la respuesta superovulatoria a nivel de ovarios en ovejas superovuladas

Los resultados obtenidos permitieron establecer la similaridad en el conteo de cuerpos lúteos observados por medio de ultrasonografía y los encontrados en laparotomía en cada uno de los ovarios. Se puede concluir que la técnica de ultrasonografía reproductiva es una herramienta eficaz para determinar la respuesta en tratamientos de superovulación en ovejas; esto concuerda con lo reportado por otros investigadores (Bartlewski et al., 2016) (Rodríguez et al., 2019) quienes sugieren que la ecografía es un método versátil de carácter no invasivo que es ideal para monitorear el estado de los ovarios después de los tratamientos superovulatorios en las ovejas. Aunque la enumeración precisa de los folículos preovulatorios y la de CL puede ser difícil con la ecografía (un alto número de CL disminuye la precisión de la detección de estructuras ováricas individuales), ayuda a

identificar las ovejas que responden mal. Asimismo, la mayoría de investigadores concuerdan en reportar una gran cantidad de Cuerpos Lúteos (promedios de 11 a 12, $p > 0.05$) como fue el caso de nuestro estudio. Sin embargo (A. Gibbons et al., 2011), menciona que un porcentaje de hembras usualmente no responden al tratamiento hormonal de ovulación múltiple; en nuestro estudio todas las hembras respondieron a los tratamientos, aunque algunos animales tuvieron respuestas pobres con la presentación de (4) CL mientras otras tuvieron muy buenas respuestas con (30) CL con un promedio de (16.4) CL. Nuestros resultados concuerdan con estudios similares realizados por (Brasil et al., 2016), donde los grupos observados presentaron una respuesta superovularia alta (promedios que van desde 14.33 a 16.18 folículos ≥ 4 mm, con un valor $p > 0.05$). (Galan et al., 2020) utilizaron laparoscopia para evaluar la respuesta de las ovejas a su tratamiento de superovulación con base en el número de CL; donde evaluó el uso de flunixin meglumina (FM) y gonadotropina coriónica humana (hCG) en la regresión temprana de los CL buscando mejorar la respuesta superovulatoria, sin embargo, la tasa de superovulación fue muy baja en todos los tratamientos, el tratamiento control $4,0 \pm 0,0$, el tratamiento FM $9,33 \pm 1,76$ y el tratamiento hCG $4,66 \pm 0,88$, estos resultados se acercan a los obtenidos por (Figueira, et al., 2020) quien reporta un promedio de CL $7,0 \pm 1,1$ y $6,6 \pm 1,4$ en un estudio de superovulación y sincronización con progestagenos a 6 y 9 días, respectivamente, en ovejas lacaune lactantes. Y difieren en comparación con los resultados obtenidos en nuestra investigación.

Trabajos realizados por (Bruno-Galarraga et al., 2015; Cognie, 1999) mencionan tener presente que un porcentaje de hembras no responderá al tratamiento hormonal de superovulación múltiple, y reportan que el número de embriones fue mayor para las ovejas con respuesta alta en relación con las ovejas con respuesta baja (7.2 ± 3.7 y 4.0 ± 3.9 ; $p < 0.05$), mientras que las tasas de recuperación y fertilización fueron similares entre los grupos, así mismo varios autores obtienen con distintos biotipos

raciales respuestas a MOET determinadas con el número de CL: en Katadhin $11,0 \pm 1,3$ (Luna-Palomera et al., 2019); Dorper 11.3 ± 0.3 (Loiola Filho et al., 2015); Santa Inés 10.6 ± 1.6 (Maria E.F. Oliveira et al., 2014), además que la tasa de recuperación en la raza Katadhin es 91% y en la raza Santa Inés 77%, siendo estos resultados mayores a los que encontramos en nuestra investigación, a diferencia a lo observado en otras razas, como Corriedale (49–68%) y Dorper (57%) que se aproximan a los resultados obtenidos en nuestra investigación, esto se podría explicar debido a una mejor respuesta a la ovulación múltiple de razas más prolíficas. De la misma manera (Rebolledo et al., 2017) realiza estudios donde evalúa la respuesta superovulatoria en varias razas ovinas de pelo por medio de la identificación de folículos con Ultrasonografía y CL con laparoscopia obteniendo para la raza Dorper 11.84 ± 1.41 , Pelibuey 5.60 ± 1.38 , Katahdin 7.54 ± 1.54 , Black Belly 9.04 ± 1.47 . esto contrasta con las trihíbridas de nuestro estudio.

En la presente investigación se utilizaron ovejas con rangos de edad entre (1 a 5 años) pertenecientes a cruces de las razas Katahdin, Pelibuey y Dorset con un peso promedio de 35.8 kg y una condición corporal con mayor frecuencia de 4 en una escala de 1 a 5 donde las ovejas no habían sido sometidas previamente a tratamientos de superovulación, transferencia embrionaria y eran animales de talla media. En consecuencia, los valores obtenidos son favorables. Por esta razón, antes de incorporar los animales a programas de biotecnología son necesarios aspectos de nutrición, sanidad y reproductivos, donde las ovejas hembras deben alcanzar una condición corporal de 2.5 a 3 un mes antes de tratamientos de biotecnología (Cueto et al., 2011).

La alimentación juega un rol muy importante en la respuesta a los tratamientos hormonales de superovulación, pues este estudio se realizó dado que se ha evidenciado baja respuesta a procesos superovulatorios en condiciones corporales mayores a 4.

Otro punto importante de resaltar es el número de partos al iniciar el tratamiento superovulatorio; ya que en nuestros resultados de CL para las ovejas primíparas se obtuvo en promedio $15,6 \pm 6,4$ y para las múltiparas $17,2 \pm 7,8$; resaltando que un mayor número de partos incrementa el intervalo parto-gestación lo cual también puede estar relacionado con la respuesta a procesos superovulatorios (Bartlewski et al., 2015), convirtiéndose en una característica positiva a nivel reproductivo, considerado por algunos autores como determinante para una mejor respuesta a tratamientos de superovulación.(Figueira et al., 2020; Simonetti et al., 2008).

De la misma manera otro factor a considerar es el tipo de FSH utilizada. En nuestro estudio las hembras fueron superovuladas (SOV) con pluset®; al comparar otros estudios, el uso de pluset® resultó efectivo en la respuesta superovulatoria, destacando que preparaciones de FSH lograrían una mejor respuesta dependiendo de la relación FSH:LH la cual es crítica para el desarrollo preovulatorio de los folículos y la ovulación (D'Alessandro y Martemucci, 2016). Las preparaciones comerciales contienen altas cantidades de FSH y variables de LH, dependiendo del proveedor o marca. En el caso del Pluset se reporta cantidades iguales de FSH y LH (relación 1:1) lo cual puede ser benéfico (Simonetti et al., 2008). Un alto contenido en LH se asocia con una reducción de respuesta ovulatoria; por lo tanto, la tendencia ha tornado hacia la utilización de gonadotrofinas más purificadas (Chupin *et al.*, 1987; (Torres & Sevellec, 1987). (Bettencourt et al., 2008) realizó una comparación entre FSH pura (Ovagen) y FSH con LH (Pluset®) en ovejas Merino Negro Portuguesa destacando mejores resultados con Pluset®. Se obtuvo una mayor tasa de recuperación, y mayor cantidad de embriones mediante lavados por laparotomía.

En nuestra investigación, la tasa de presentación del estro fue del 100% de la muestra, similar al encontrado por (Mayorg et al., 2011) y por (González-Bulnes et al., 2004) quienes registraron un porcentaje de

presentación de celo entre 65 y 100% en su investigación, utilizando el dispositivo intravaginal con acetato de medroxiprogesterona en combinación con PMSG y D-cloprostenol. (Grizelj et al., 2013) indican que la ultrasonografía Modo-B o de tiempo real, es una técnica rápida y precisa para diagnosticar el diámetro folicular y la presencia de cuerpos lúteos con una exactitud cercana al 90%, se considera un método eficiente para el seguimiento y reconocimiento de las estructuras ováricas en las ovejas y cabras, generando medidas exactas sin necesidad de anestésicos, pero con la experticia del operario para garantizar su efectividad. (Contreras-Solis et al., 2008) en su estudio evaluaron el uso de la ecografía transrectal (US), para la detección y medición de los cuerpos lúteos (CLs), concluye de acuerdo a sus resultados que un CL funcional puede ejercer efectos tanto sistémicos como locales sobre la población de folículos, afectando la dominancia que ejercen los folículos grandes, indicando que esta técnica depende de la pericia del ejecutor, “El Cuerpo lúteo es la principal estructura durante la fase lútea del ciclo estral de los mamíferos”, según lo establece (Vargas & Chacón, 2016). La presencia del CL en el ovario manifiesta la ovulación; por lo tanto, su conteo por métodos de laparotomía, permite una estimación de la producción de embriones; sin embargo, afecta el bienestar de los animales debido al tipo de técnica invasiva la cual requiere anestesia y riesgo a contaminación secundaria en la zona quirúrgica.

En trabajos donde evaluaron desempeño reproductivo de ovejas sometidas a tratamiento superovulatorio como el de (Forcada et al., 2012), quien busca determinar si la inseminación intrauterina se asocia con tasas más altas de recuperación consecutivas de embriones, reporta $21,7 \pm 2,2$ vs $11,8 \pm 1,1$ cuerpos lúteos para la primera y segunda recuperación, concluyendo que la respuesta a los tratamientos MOET parece depender de la edad de la oveja donante, por esto muchas no responden como se esperaría, por su parte (M. E.F. Oliveira et al., 2019) realiza exámenes

ecográficos en modo B y Doppler espectral diariamente durante el tratamiento superovulatorio para enumerar los folículos antrales ováricos y determinar los índices de flujo sanguíneo ovárico, concluyendo que no existen diferencias en las respuesta superovulatoria entre los ovarios / cuernos uterinos izquierdo y derecho; de acuerdo con estos estudios y nuestros resultados es importantes el uso de una herramienta como la ultrasonografía que nos permite tener un estimativo de la respuesta superovulatoria en cuanto a la cantidad de CL evitando el uso de métodos más complejos e invasivos como laparoscopia, laparotomía o análisis hormonales.

Con la técnica de laparotomía se detectaron un total de 410 cuerpos lúteos y un promedio de 8 por ovario; sin embargo, el rango de ovulación resultante fue de 0 a 18, el cual varió en el método ecográfico (4 – 15).

3.11.2 Respuesta superovulatoria, tasa de recuperación, grado de desarrollo embrionario y calidad de embriones ovinos obtenidos in vivo.

El protocolo de superovulación utilizado en este estudio fue exitoso debido a que se obtuvo buena tasa de recuperación de embriones por parte de las ovejas tratadas. Un factor importante en un protocolo de superovulación es la sincronización complementada con el tratamiento de progesterona. (Cuadro et al., 2018), también reporta que la tasa de fertilización de los oocitos y la calidad del embrión mejoran con la administración de progesterona durante la superestimulación con FSH, lo que sugiere un papel importante de la progesterona durante el desarrollo folicular preovulatorio. Igualmente, la mayoría de estudios concluyen que la combinación de hormonas utilizadas, el momento y la duración del tratamiento con estas hormonas y las dosis utilizadas pueden hacer variar las respuestas de un protocolo de estimulación o sincronización. Bartlewski et al. (2015), concuerda con los beneficios de tratamientos de superovulación asociados a esponjas intravaginales liberadoras de acetato de medroxiprogesterona (MAP) (60 mg). (Aké-lópez et al., 2014); reporta que en cuanto al protocolo

de superovulación y los intervalos de aplicación de la FSH(p) el número de embriones recuperados por oveja (9,3) fue mayor al comparar con otras investigaciones donde el promedio manejado en literatura corresponde a 6 embriones por oveja; además se logró un porcentaje alto en calidades de excelente a buena (91%), infiriendo que el cruce utilizado puede potencializar las características reproductivas, (prolificidad) de las razas Kathadin, Pelibuey y Dorset. No se observó hiperestimulación o regresión lútea prematura, frecuentemente asociada con la pérdida de embriones.

El protocolo también incluyó la aplicación de gonadotropina coriónica equina (eCG) en dosis de 300 UI obteniendo resultados semejantes o comparables en cuanto tasas de ovulación, número medio de estructuras recuperadas totales, embriones de alta calidad en experimentos similares en otras condiciones ambientales genéticas y de manejo (Gonzalez-Bulnes et al., 2004),(Quan et al., 2011), (Panyaboriban et al., 2018), (Mpebe et al., 2018), (Bruno-Galarraga et al., 2015), (Maciel et al., 2019) y(Gomes Bergstein-Galan et al., 2020). Contrariamente, el grupo de (Luna-Palomera et al., 2019) compararon la respuesta superovulatoria, tasa de ovulación, tasa de recuperación y la tasa de fertilización entre grupos de ovejas tratados con FSH y Grupos de FSH + eCG. El número de estructuras totales que se recuperó y el número de embriones no difirió ($P > 0,05$) entre los tratamientos. Sin embargo, el número de los embriones transferibles fue mayor ($P < 0,01$) en ovejas tratadas solo con FSH ($4,7 \pm 0,7$ embriones) que en las ovejas FSH + eCG ($1,1 \pm 0,8$ embriones).

En los últimos años varios investigadores reportan que se han logrado mejoras significativas en la recuperación de embriones mediante las técnicas de lavado de embriones por laparoscopia e incluso por vía transcervical ((Sang et al., 2008), (Abubakar et al., 2014), (Garcia-Dominguez et al., 2019), (Fonseca et al., 2019) y (Figueira, Alves, Souza-Fabjan, et al., 2020). (Li et al., 2008) reporta también una buena tasa de recuperación con una técnica de mini laparotomía. Estas técnicas no son

tan utilizadas como el método de recolección de embriones por laparotomía y los resultados parecen ser inferiores (Figueira et al., 2019). Las tasas de recuperación (58%) en el presente estudio son superiores a las reportadas por (Prellwitz et al., 2019) en ovejas Santa Inés superovuladas con un (41.2%) e inferiores a las reportadas recientemente por (Khunmanee et al., 2020) donde obtienen una tasa de recuperación del 65% en animales superovulados, recomiendan su uso en campo y su viabilidad de aplicación a nivel comercial con pequeños productores por sus resultados favorables con la técnica de laparotomía.

Tasas de recuperación embrionaria número de partos : No se encontraron diferencias significativas entre los embriones recuperados y los grupos de estudio según el número de partos (primíparas y multíparas); asimismo, se obtuvieron en promedio total de 9,3 embriones y una desviación estándar de ± 4 embriones por oveja, en un rango de 1-16. En cuanto a los promedios de embriones recolectados, para el grupo I primíparas (un parto) fue de 8,75 con una desviación estándar de $\pm 4,07$ embriones (rango 1-15) y para el grupo II multíparas, el promedio de embriones fue de 9,75 con una desviación estándar de $\pm 3,96$ embriones (rango 4-16); ambos promedios son superiores a los reportados por (Herrera-Camacho et al., 2008) de 6 a 7 embriones por oveja así como los obtenidos por (Blanco et al., 2003) con promedios de $1\pm 0,5$ y de $1,2 \pm 0,6$ embriones por donadora; estudios realizados en Brasil reportan promedios de recuperación en ovejas de acuerdo a la raza Dorper $9,07\pm 7,08$ y Dorper Blanco 7.06 ± 5.27 por (Galan et al., 2019), resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, así mismo ellos reportan en diferentes estaciones del año promedios de recuperación de embriones, para primavera $10,05\pm 6.6$, en verano $9,31\pm 6,9$, en otoño $6,8\pm 6,31$ y en invierno $7 \pm 6,64$; por edad, animales de 12 a 24 meses $6,88\pm 5,27$, de 25 a 48 meses $8,15\pm 6,46$ y de 49 a 96 meses $9,76\pm 7,41$; estos autores además concluyeron que el pico de producción de embriones se produce clásicamente alrededor de los 6 años de edad. También están los

reportados por (Torres-Zapata et al., 2016) en la raza Katahdin con una muestra de 20 hembras donde se logró recuperar un promedio de 8 embriones *in vivo* por oveja con clasificación en los grados uno (excelentes) y dos (bueno) con una tasa del 85% de efectividad. También existen estudios donde se reportan mayor cantidad de embriones, como lo expuesto por (López et al., 2013) quienes reportaron 14 embriones por hembra y (Forcada et al., 2011), cuyo promedio osciló entre 12 a 15 embriones. Además, (P. M. Bartlewski et al., 2017) reportando resultados inferiores a los obtenidos en el estudio que realizamos, puesto que ellos reportan promedios de embriones recuperados en los dos grupos de ovejas tratadas MOET con dosis de FSH porcina (pFSH) 2,5 ml × 1 y 1,25 ml × 5), administradas aproximadamente a las 0800 y 1600 h (Grupo 1, n = 9) o a las 0800 y 2000 h (Grupo 2, n = 16). Y obtienen para cada grupo respectivamente promedio de embriones de 8.0 ± 2.6 (0–24) y 5.9 ± 1.3 (0–16) con una tasa de recuperación embrionaria de 47 % para los dos grupos con modificación en el tiempo de aplicación, donde se considera relevante su diferencia; no obstante, en la presente investigación se muestran resultados superiores en promedio embriones $9,75 \pm 3,96$ y una tasa de recuperación de 58%; A su vez la calidad de los embriones obtenidos de acuerdo a los factores propios de nuestra región como los ambientales y productivos, especialmente los nutricionales (condiciones corporales), genéticos (biotipos raciales) y de manejo (primíparas y multíparas) de las ovejas donadoras, convirtiéndose este estudio en el primer reporte de MOET, obteniendo información valiosa para futuros procesos de criopreservación embrionaria, en relación con el número de embriones obtenido y calidad de estos cada 12 horas y en dosis decrecientes. En estudios hechos por (M. E.F. Oliveira et al., 2017), se realizó un manejo similar al utilizado en la presente investigación en ovejas raza Santa Inés, obteniéndose una menor tasa de recuperación de embriones con relación en la superovulación de concentraciones circulantes

de hormonas reproductivas, estado ovárico y flujo sanguíneo folicular antral (Bartlewski et al., 2016). De otro lado, existen estudios con resultados similares a los obtenidos en la presente investigación como el de Navarrete-Sierra et al. (2008) que reportaron entre 9 a 13 embriones por oveja y los resultados de (Cueto et al., 2011). Al identificar los estados recuperados según el número de partos se encontró que no existieron diferencias significativas en la proporción de mórulas (72.9% para un solo parto y 76.4% para múltipara), asimismo no se observó relación con la proporción de blastocistos (18.6 para un solo parto y 21.1% para Múltipara).

En el presente estudio, no hubo diferencia entre los dos grupos de ovejas primíparas y múltiparas en el número de embriones recuperados, la calidad y el desarrollo en cuanto a los resultados obtenidos, pues la concordancia obtenida mediante la prueba de W Kendall es media. Aunque en nuestro estudio de acuerdo con los resultados obtenidos no hay relación ni concordancia con el número de partos, las tasas de ovulación y recuperación de embriones en la literatura muchos investigadores afirman que ovejas adultas tienen una mayor tasa de ovulación y producción de embriones, por ejemplo, en las borregas se presenta una mayor proporción de embriones de alta calidad. (Alejandro Gibbons et al., 2019). Las tasas de recuperación de embriones obtenidas en nuestro estudio son superiores a las conseguidas por (Herrera-Camacho et al., 2008) donde se estimaron en un rango de 4 a 5 embriones, Simonetti *et al.*; (2008) entre 3.3 a 5.5 embriones en donadoras, (Martínez-Rojero et al., 2017a) entre 0-5 embriones por oveja, y en la raza Merino con valores de 7 embriones por oveja (Gibbons et al., 2019) esto contrasta con lo reportado por varios trabajos, en biotipo lanar cárnico (Shi et al., 2015) raza Suffolk, (Bartlewski et al., 2015b) en raza Dorset, en ovejas biotipo lechero (Merañ et al., 2017) y biotipo cárnico de pelo (Luna-Palomera et al., 2019) en raza Katahdin, (Martínez-Rojero et al., 2017) en Pelibuey, donde existe una amplia variabilidad de resultados en ovejas sometidas a tratamientos

superovulatorios de acuerdo al biotipo o raza de la oveja en cuanto a su cantidad y calidad de embriones; para nuestro caso utilizamos ovejas biotipo cárnico trihíbridas cruces razas lanares y de pelo (Kathadin, Pelibuey y Dorset) siendo el primer reporte en la región sobre tratamientos de superovulación.

Desarrollo y evaluación del embrión: La evaluación morfológica de un embrión considera los siguientes criterios sobre las estructuras y cualidades de un embrión de excelente calidad: forma esferoide, apariencia clara y neta de los blastómeros, uniformidad de la membrana celular, simetría de los blastómeros, tonalidad oscura y uniforme, proporcionalidad entre el embrión y el espacio perivitelino, integridad de la zona pelúcida, ausencia de vacuolas en el embrión y bridas celulares en el espacio perivitelino todo esto de acuerdo a la IETS. (Stringfellow & Givens, 2010)

El 100% de las estructuras recolectadas fueron embriones, lo que permite inferir que el manejo de servicios con monta natural y tratamiento de superovulación empleado fue exitoso. (Romão et al., 2016) recolectó el 4.8% de los embriones en estado de mórula tempranas, 25.4% en mórula compacta, 38.1% de blastocistos y 31.7% en blastocistos eclosionados. (M. E.F. Oliveira et al., 2020) recuperaron el 8.2% de mórulas, 22.8% de mórulas compactas, 9.2% de blastocistos y 4.1% de blastocistos eclosionados. La evaluación embrionaria en la mayoría de trabajos se basa en parámetros de la IETS que comprometen el desarrollo embrionario abarcando procesos como la proliferación celular y el desarrollo embrionario, generando su viabilidad; por esto la importancia de evaluar imparcialmente las estructuras recuperadas, asimismo existen resultados como los que reporta (Herrera-Camacho et al., 2008) con 51.52% en los estados viables para transferencia. Estos estudios son similares a la presente investigación donde se recuperaron 38.4% para mórulas tempranas, 36.3% mórulas compactas, 19.9% blastocistos y 5.4% para blastocistos eclosionados. También son cercanos a los obtenidos por

(Garcia Kako Rodriguez et al., 2019) quien logró recuperar 63.3% en estados de mórula compacta y blastocisto, al igual que los resultados obtenidos por (Loiola Filho et al., 2015) encontrando un 50% en iguales etapas de desarrollo.

Calidad embrionaria: Los embriones recolectados variaron en calidad, el 41% del total de embriones presento calidad excelente, en calidad buena el 50 % y el 9% restante de calidad regular. La determinación del grado de calidad del embrión permite definir en términos más objetivos las probabilidades, viabilidad de desarrollo y posterior nacimiento de una cría a partir del embrión obtenido. Los diferentes grados de calidad son determinados por medio de la observación microscópica de la morfología con ayuda de un estereoscopio, existen cuatro clasificaciones de calidad (excelente, bueno, regular y malo) embrionaria, desarrolladas.

Tanto la observación, como la clasificación entre cada uno de los embriones obtenidos dependerá de cada evaluador y de su experiencia. En nuestro estudio encontramos más del 41 % n=222 calidades excelentes, donde el desarrollo (mórulas y blastocistos) corresponde al día de la recolección, no existen daños, deterioros o defectos. Los blastómeros son claramente visibles, de color y estructuras uniformes, simétricos, de forma esferoide y la zona pelúcida está intacta y también obtuvimos buenos con un 50%; en estos se observa que los embriones tienen muy pocos blastómeros desprendidos de la masa celular y/o posee una pequeña cantidad de detritus celulares, su forma puede ser ligeramente irregular.

La calidad embrionaria no se vio afectada por el número de partos donde el comportamiento en ambos grupos no muestra diferencias significativas; sin embargo, las donadoras multíparas presentan mejores calidades de embriones en comparación con el grupo de primíparas (aunque no significativamente); de igual manera para el caso de condición corporal 4 se presenta una mejor calidad de embriones recuperados alcanzando 61,7 % de embriones excelentes y buenos comparados con 29,3 % de la condición corporal 3. La calidad

embrionaria reportada en la presente investigación refleja una tasa de recuperación del 91% con embriones de calidades excelente y buena, adecuados para transferencia y/o criopreservación en estados de mórulas y blastocistos. Al comparar los resultados expuestos por (López et al., 2013) donde obtuvo para cada categoría un promedio del bueno 60.3%, excelente 22.2%, regular 9,5% y malo 7,8% respectivamente, con un 82.5% de embriones transferibles, y los resultados reportados por Martínez et. al., (2010) donde recuperó en calidad excelente un 32.5 % en ovejas de la raza Pelibuey, se infiere que la metodología implementada en la presente investigación fue exitosa; los anteriores resultados presentan una calidad más pobre o baja de los reportado por Torres *et, al;* (2016) donde obtuvo estructuras de blastocistos y blastocistos expandidos con calidades de excelente (22 estructuras), buena (16 estructuras) y regular-pobre (18 estructuras) en la raza Katahdin, al igual que el estudio dado por (Maza-Ramos, et al, 2017) donde lograron recuperar en 12 ovejas de raza Pelibuey, mórulas y blastocistos con 48 estructuras en calidad B (buena) y 15 con calidad D (regular), donde se lograron recuperar 50 mórulas entre tempranas y compactas de calidad excelente(A) y 52 en calidad buena (B) y blastocistos 7 en calidad excelente y 19 en calidad buena, todos viables para transferencia, en cuanto a la relación entre la calidad embrionaria y el número de partos, no se encontraron diferencias significativas al presentar una relación débil de 0,04 ($p > 0,58$), con resultados de los grupos I (primíparas) y II (multíparas) de 19,2%% vs 19,8% para el grado A, 21.9% y 28% grado B, así como 6.8% y 4.1% para el grado C. Sin embargo, relaciona los conceptos de la influencia de edad en la producción y calidad de embriones en animales jóvenes y adultos, con mayores respuestas en embriones de calidad A y B. (Brasil et al., 2016) establece como factor fundamental, la calidad embrionaria, cantidad de daños físicos encontrados y daños por procedimientos de manipulación sin discriminar la cantidad de

partos anteriores al proceso de recuperación; es decir que se puede concluir que la presente investigación realizó un procedimiento eficiente y su metodología acorde en relación con la calidad embrionaria obtenida.

Por otra parte, investigadores como (Abecia et al., 2015) reportan otros factores que pueden influir en la calidad embrionaria y potencial reproductivo a nivel de nutrición inadecuada de la donadora, no sólo reduce las tasas de ovulación, también la cantidad y calidad de embriones afectando su viabilidad; convirtiéndose la nutrición, el estrés calórico, estrés psicológico, enfermedades y contaminación ambiental, en los factores que pueden influir en la respuesta a tratamientos superovulatorios. Así mismo se pueden ver afectadas las futuras crías en cuanto a sus potenciales productivos, crecimiento, desarrollo y reducir su eficiencia reproductiva, en el presente trabajo se controlaron y se mantuvieron siempre condiciones adecuadas a nivel de bienestar animal.

Al evaluar la calidad embrionaria y su relación con el número de partos según el coeficiente de Concordancia de rango de Kendall o Tau B de Kendall, resultó en una Concordancia media por que para ambos casos donde la calidad embrionaria y el número de partos produjo un valor de 0,049 y la calidad embrionaria con condiciones corporales un valor de 0,051 y valor p de significancia estadística de 0,27 y 0,24 respectivamente; estos valores denotan una Concordancia media donde fue posible lograr una alta recuperación en calidad A (excelente) para los estadios de mórula temprana y blastocisto de forma similar en los grupos I y II (19 % y 22 % respectivamente). Para el estadio de blastocisto transferible, los dos grupos presentaron resultados sobresalientes para la calidad B (23% para grupo I y 27% para grupo II) y la condición corporal de 4 se relaciona con la generación de mejores resultados en torno a calidad y cantidad de embriones recuperados obteniéndose un 90 % de estos. Esto se podría deber a varios factores como los protocolos de superovulación utilizados, las montas controladas, los biotipos y el estado nutricional en que se encontraban los animales en la presente investigación.

3.11.3 Efecto de la vitrificación y el sistema de empaque (abierto y cerrado) sobre la tasa de supervivencia de embriones ovinos obtenidos in vivo.

A pesar de que se han realizado múltiples estudios que muestran las ventajas del método vitrificación, la discusión todavía se mantiene alrededor de los empaques relacionados con la exposición directa al nitrógeno líquido (sistemas abiertos) y al sistema estéril sin contacto con nitrógeno líquido (sistemas cerrados). La presente investigación encontró una viabilidad general de la vitrificación de embriones ovinos *in vitro* del 70%; al contrastar los resultados obtenidos en investigaciones realizadas por (Romão et al., 2016), se observa una mayor robustez con respecto a otros estudios, como los de (de Araújo-Lemos et al., 2014) que compararon la vitrificación con OPS en embriones *in vivo* e *in vitro*; de esta manera podemos resaltar mejores resultados en embriones obtenidos *in vivo* con el uso de la combinación de crioprotectores para la vitrificación de DMSO/EG, resultando más efectivo para la crioconservación, en comparación con la congelación convencional.

El uso de la vitrificación como método de criopreservación de embriones ovinos obtenidos *in vivo* es eficiente pues se obtuvieron resultados satisfactorios en relación de las tasas de sobrevivencia embrionaria; a nivel *in vitro* para el sistema de empaque abierto fue del 72,5% y para el sistema cerrado del 67,6%: para la evaluación *in vivo*, las tasas de preñez fueron de 40% para OPS y 20% pajilla 0,25cc, demostrando la factibilidad de su aplicación en campo o a nivel comercial en nuestras condiciones de manejo y nuestros animales. En otras investigaciones realizadas por (Varago et al., 2014), se evaluó la eficiencia de los crioprotectores dimetilformamida y etilenglicol para la criopreservación de embriones ovinos mediante vitrificación y congelación convencional. Se utilizaron metodologías de tinción con yoduro de propidio y Hoechst 33258 para evaluar la viabilidad bajo microscopía fluorescente; también se midieron tasas de reexpansión y eclosión después del cultivo y se determinó el índice apoptótico con técnica

TUNEL. La dimetilformamida y el etilenglicol no fueron eficientes en el proceso de vitrificación al compararlos con la congelación convencional. Sin embargo investigadores como (de Araújo-Lemos et al., 2015) reportan en vitrificación de embriones en pequeños rumiantes mejores resultados donde los embriones vitrificados tenían una mayor preservación de la estructura celular que los embriones de la congelación convencional con EG. La vitrificación DMSO/EG generó más altas tasas de reexpansión *in vitro* (47.36%) que la vitrificación DMF / EG (31.58%); estas tasas son más bajas que las que obtuvimos en nuestro estudio donde se obtuvieron tasas de 67,6% para embriones vitrificados con Pajilla y 72,5% para OPS. Pocos estudios han evaluado los efectos de la vitrificación sobre embriones producidos *in vivo*. Algunos estudios utilizan como tratamiento de control embriones *in vivo* con los obtenidos *in vitro* y comparan la vitrificación con diferentes crioprotectores, empaques y su posible aplicación en campo como una alternativa para los ovinocultores en programas de mejoramiento genético y multiplicación de genética, validando el uso de dos sistemas bajo condiciones productivas en el entorno cercano a la presente investigación y aplicación de biotecnologías reproductivas especialmente en criopreservación de embriones, mediante vitrificación de embriones para programas de superovulación y transferencia de embriones ovinos.

(Bhat et al., 2015) concluyen respectivamente que la congelación y vitrificación convencionales usando DMSO tienen eficiencias similares para la criopreservación de embriones y las combinaciones de diferentes crioprotectores y concentraciones etilenglicol (EG), de dimetil sulfóxido (DMSO); asimismo la vitrificación OPS genera mayores eficiencias para la criopreservación de embriones.

(Ledda et al., 2019), realizó una evaluación de supervivencia de embriones producidos *in vitro* en donde se prueba un nuevo dispositivo de vitrificación "E.Vit", compuesto por una pajita de 0,25 ml con una rejilla de policarbonato de 50 poros en un extremo y utilizó un tratamiento de control con embriones frescos; con la observación de la reexpansión y eclosión de los embriones

cultivados se observaron altas tasas de supervivencia, concluyendo el potencial uso en la transferencia directa de embriones en condiciones de campo. (García-Domínguez et al., 2019) reportan el uso de pajillas 0,25 en vitrificación de varios embriones con tasas del 40% en diferentes estadios embrionarios. Otros trabajos como el de (Momozawa et al., 2017); donde realizaron evaluaciones de diferentes empaques como Cryoroom o Cryotop utilizados en embriones de ratón y humanos han obtenido tasas muy altas con respecto a lo reportado por (Inui et al., 2019), y los obtenidos por nosotros estos investigadores reportan tasas de reexpansión de 100% y de eclosión del 91.8%, las cuales fueron significativamente más altas para los blastocistos vitrificados usando un Kit comercial.

3.11.4 Supervivencia a los procesos de vitrificación y empaque, de acuerdo a la tasa de preñez, de embriones ovinos producidos *in vivo*.

La presente investigación encontró una viabilidad general de la vitrificación de embriones ovinos *in vitro* del 70%; al contrastar los resultados obtenidos en investigaciones realizadas por (Romão et al., 2016), se observa una mayor robustez con respecto a otros estudios, como los de (de Araújo-Lemos et al., 2014) que compararon la vitrificación con OPS en embriones *in vivo* e *in vitro*; de esta manera podemos resaltar mejores resultados en embriones obtenidos *in vivo* con el uso de la combinación de crioprotectores para la vitrificación de DMSO/EG, resultando más efectivo para la criopreservación, en comparación con la congelación convencional.

El uso de la vitrificación como método de criopreservación de embriones ovinos obtenidos *in vivo* es eficiente pues se obtuvieron resultados satisfactorios en relación de las tasas de supervivencia embrionaria; a nivel *in vitro* para el sistema de empaque abierto fue del 72,5% y para el sistema cerrado del 67,6%: para la evaluación *in vivo*, las tasas de preñez fueron de 40% para OPS y 20% pajilla 0,25cc, demostrando la factibilidad de su aplicación en campo o a nivel comercial en nuestras condiciones de manejo

y nuestros animales. En otras investigaciones realizadas por (Varago et al., 2014), se evaluó la eficiencia de los crioprotectores dimetilformamida y etilenglicol para la criopreservación de embriones ovinos mediante vitrificación y congelación convencional. La dimetilformamida y el etilenglicol no fueron eficientes en el proceso de vitrificación al compararlos con la congelación convencional. Sin embargo investigadores como (de Araújo-Lemos et al., 2015) reportan en vitrificación de embriones en pequeños rumiantes mejores resultados donde los embriones vitrificados tenían una mayor preservación de la estructura celular que los embriones de la congelación convencional con EG. La vitrificación DMSO/EG generó más altas tasas de reexpansión *in vitro* (47.36%) que la vitrificación DMF / EG (31.58%); estas tasas son más bajas que las que obtuvimos en nuestro estudio donde se obtuvieron tasas de 67,6% para embriones vitrificados con Pajilla y 72,5% para OPS. Pocos estudios han evaluado los efectos de la vitrificación sobre embriones producidos *in vivo*. Algunos estudios utilizan como tratamiento de control embriones *in vivo* con los obtenidos *in vitro* y comparan la vitrificación con diferentes crioprotectores, empaques y su posible aplicación en campo como una alternativa para los ovinocultores en programas de mejoramiento genético y multiplicación de genética, validando el uso de dos sistemas bajo condiciones productivas en el entorno cercano a la presente investigación y aplicación de biotecnologías reproductivas especialmente en criopreservación de embriones, mediante vitrificación de embriones para programas de superovulación y transferencia de embriones ovinos.

Ferreira-Silva JC, et al. (2017) y (Bhat et al., 2015) concluyen respectivamente que la congelación y vitrificación convencionales usando DMSO tienen eficiencias similares para la criopreservación de embriones y las combinaciones de diferentes crioprotectores y concentraciones etilenglicol (EG), de dimetil sulfóxido (DMSO); asimismo la vitrificación OPS genera mayores eficiencias para la criopreservación de embriones.

(Ledda et al., 2019), realizó una evaluación de supervivencia de embriones producidos *in vitro* en donde se prueba un nuevo dispositivo de vitrificación "E.Vit", compuesto por una pajita de 0,25 ml con una rejilla de policarbonato de 50 poros en un extremo y utilizó un tratamiento de control con embriones frescos; con la observación de la reexpansión y eclosión de los embriones cultivados se observaron altas tasas de supervivencia, concluyendo el potencial uso en la transferencia directa de embriones en condiciones de campo. (García-Domínguez et al., 2019) reportan el uso de pajillas 0,25 en vitrificación de varios embriones con tasas del 40% en diferentes estadios embrionarios. Otros trabajo como el de (Momozawa et al., 2017); donde realizó evaluaciones de diferentes empaques como Cryoroom o Cryotop utilizados en embriones de ratón y humanos han obtenido tasas muy altas con respecto a lo reportado por (Inui et al., 2019), y los obtenidos por nosotros, estos investigadores reportan tasas de reexpansión de 100% y de eclosión del 91.8%, las cuales fueron significativamente más altas para los blastocistos vitrificados usando un Kit comercial. No obstante se contrastan los resultados obtenidos por (Juárez-Pérez et al., 2018) donde implementaron otros biotipos de animales en condiciones medioambientales diferentes, reportaron una viabilidad embrionaria entre el 50% y 68,75% en calificación morfológica y fertilidad por estación se establecieron valores de 58.3% y 66.6% respectivamente ($P > 0.05$). De igual forma el estudio de (Khunmanee et al., 2020), obtiene mejores resultados de preñez comparados con el 40% a los establecidos en la presente investigación.

Dos Santos-Neto et al. (2017), reportan resultados de preñez y tasa de natalidad de embriones ovinos derivados *in vivo* versus producidos *in vitro* sometidos a diferentes métodos de crioconservación. Un total de 197 embriones producidos *in vivo* y 240 *in vitro* fueron criopreservados mediante congelación convencional o mediante vitrificación con métodos Cryotop o Spatula MVD el día 6 después de la inseminación / fertilización; (*in vivo* 53.3%, *in vitro* 20.8%; $P < 0.05$), donde la tasa de supervivencia después de

la transferencia de embriones fue de 67.1% para Cryotop y 40.4% para Spatula MVD. Esta investigación demuestra que la supervivencia del embrión y la tasa de natalidad de los embriones ovinos producidos *in vivo* e *in vitro* se mejora mediante vitrificación con el método Cryotop de volumen mínimo. Esto también lo ha reportado otros investigadores en esta y otras especies: (Juárez-Pérez et al., 2018; Khunmanee et al., 2020) en ovejas; Oliveira et al., (2020), en cabras, (Caamaño et al., 2015) y (Morató & Mogas, 2014), en bovinos; (Bottrel et al., 2020) en burros y (Truong & Gardner, 2020) en ratones: estos investigadores han concluido que los protocolos en un paso pueden ayudar a prevenir la ruptura cuando los embriones se calientan directamente en sacarosa a 0,5 M. Otros estudio comparó el efecto de la vitrificación MVD de espátula de volumen mínimo (VIT) versus la congelación lenta tradicional de embriones de ratón (Meikle et al., 2018). Los embriones frescos vitrificados/calentados y de control se transfirieron a madres sustitutas, sin existir diferencias en las tasas de preñez; reportan que el método de MVD de espátula de volumen mínimo es una técnica sencilla y aplicable a campo útil para la vitrificación de embriones de ratón producidos *in vitro* o *in vivo* incluyendo la vitrificación para criopreservar embriones en varias especies. El éxito depende de varios factores como el estadio de desarrollo embrionario, origen de los embriones (*In vitro* o *In vivo*). (dos Santos Neto et al., 2015) reportó tasas de supervivencia del 69,6% al 79,7% con resultados similares para todos los grupos de vitrificación al igual que el estudio que realizamos no hay diferencias significativas entre los empaques.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- El uso de la ultrasonografía permitió detectar la respuesta superovulatoria de manera similar a las opciones quirúrgicas; por consiguiente, es una alternativa que permite evitar procesos quirúrgicos en bienestar del animal, primando una de sus cinco libertades al librarse de dolor, lesión, enfermedad y reduce costos innecesarios para los ovinocultores ya que se evitan gastos innecesarios en animales que no responden a tratamientos superovulatorios. El número total y promedio de cuerpos lúteos detectados por ultrasonografía (375 y 7,5 respectivamente), laparoscopia (350 y 7,0) y laparotomía (410 y 8,2) fueron similares; además los valores de concordancia indican un grado de acuerdo entre las técnicas.
- Las tasas de recuperación de desarrollo y calidad de embriones ovinos obtenidos *in vivo* por medio de un protocolo de superovulación instaurado en hembras trihíbridas en la presente investigación muestra que estadísticamente existe una Concordancia media, entre la calidad embrionaria y la condición corporal, en especial la condición corporal 4 donde se obtuvieron los mejores resultados de calidad embrionaria.
- El uso de la vitrificación como método de criopreservación de embriones ovinos obtenidos *in vivo* es eficiente gracias a la obtención de resultados satisfactorios en relación con las tasas de sobrevivencia embrionaria *in vitro* e *in vivo* para el sistema de empaque abierto (OPS) y cerrados (Pajilla 0,25 cc). En las evaluaciones *in vitro* e *in vivo*, no se encontraron diferencias estadísticas entre los dos procesos demostrando factibilidad en su aplicación en campo o a nivel comercial.

4.2 Recomendaciones

- Continuar futuras investigaciones sobre el uso de estas biotecnologías referidas a la respuesta de receptoras a procesos transferencia de embriones vitrificados según el número de partos, condición corporal en trihíbridos, tener unas estructuras transferibles a vientres receptores con la finalidad de evaluar su capacidad de implantación en la técnica de reproducción asistida ART para el departamento de Boyacá y en Colombia; debido a que el conocimiento teniendo en cuenta condiciones locales es escaso y poco documentado en torno a reproducción asistida con técnica en biotecnología entorno a la proliferación de producciones ovinas existentes.
- La utilización de la vitrificación como alternativa a tratamientos de criopreservación de embriones e implementación por profesionales y productores sugiere una masificación del uso de estas biotecnologías reproductivas en pequeños rumiantes, específicamente el uso de ultrasonografía en evaluación a tratamientos de superovulación, transferencia y criopreservación de embriones y proyección de su uso en campo mediante procesos de vitrificación con cualquier sistema de empaque en búsqueda de aumentar el número de animales evaluados a nivel *in vivo* así lo cual permite el sustento y mejoramiento de estas técnicas entorno a parámetros productivos.

Bibliografía

- Abecia, J. A., Forcada, F., Palacín, I., Sánchez-Prieto, L., Sosa, C., Fernández-Foren, A., & Meikle, A. (2015). Undernutrition affects embryo quality of superovulated ewes. *Zygote*, 23(1), 116–124. <https://doi.org/10.1017/S096719941300035X>
- Abubakar, A. A., Andeshi, R. A., Yakubu, A. S., Lawal, F. M., & Adamu, U. (2014). Comparative Evaluation of Midventral and Flank Laparotomy Approaches in Goat. *Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/920191>
- Aké-lópez, J. R., Centurión-castro, F. G., Magaña-monforte, J. G., & Aké-villanueva, J. R. (2014). Efecto del progestágeno y de la dosis de gonadotropina corionica equina en la sincronización del estro y tasa de gestación en ovejas Pelibuey inseminadas por laparoscopia. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 1(3), 261–268.
- Akiyama, K., Kobayashi, J., Sato, Y., Sata, R., Ohashi, M., Sasaki, E., Oda, Y., Ogawa, Y., Ueda, S., Nabenishi, H., & matoba, S. (2010). Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in-straw dilution. *Animal Science Journal*, 81(4), 461–466. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2010.00763.x>
- Almodin, C. G., Minguetti-Camara, V. C., Paixao, C. L., & Pereira, P. C. (2010). Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Human Reproduction*, 25(5), 1192–1198. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq042>
- Arévalo Garay, Á., & Correa Assmus, G. (2013). Tecnología en la ovinocultura colombiana: estado del arte. *Ciencia Animal*, 6, 125–142.
- Asgari, V., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Azhdari, Z. T., Mosaie, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2012). Specific activation requirements of in vitro-matured sheep oocytes following vitrification-warming. *Molecular Reproduction and Development*, 79(7), 434–444. <https://doi.org/10.1002/mrd.22047>
- Baril, G., Traldi, a. L., Cognié, Y., Leboeuf, B., Beckers, J. F., & Mermillod, P. (2001). Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56(2), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00564-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00564-7)
- Bartlewski, P. M., Seaton, P., Franco Oliveira, M. E., Kridli, R. T., Murawski, M., & Schwarz, T. (2016). Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology*, 86(1), 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.024>
- Bartlewski, P. M., Seaton, P., Szpila, P., Oliveira, M. E. F., Murawski, M., Schwarz, T., Kridli, R. T., & Zieba, D. A. (2015). Comparison of the effects of pretreatment with Veramix sponge (medroxyprogesterone acetate) or CIDR (natural progesterone) in combination with an injection of estradiol-17 β on ovarian activity, endocrine profiles, and embryo yields in cyclic ewes superovu. *Theriogenology*, 84(7), 1225–1237. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.002>
- Bergstein-Galan, T. G., Weiss, R. R., Kozicki, L. E., Bortoleto, C. T., Lara, N. S. S., & Aschenbrenner, G. A. (2020). EFFECT OF FLUNIXIN MEGLUMINE AND hCG AT COMMERCIAL PROGRAMS FOR MULTIPLE OVULATION AND EMBRYO TRANSFER (MOET) IN SHEEP. *Archives of*

- Veterinary Science*, 5(1), 56–66. www.ser.ufpr.br/veterinary
- Bergstein-Galan, Tácia Gomes, Weiss, R. R., & Kozicki, L. E. (2019). Effect of semen and donor factors on multiple ovulation and embryo transfer (MOET) in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(2), 401–407. <https://doi.org/10.1111/rda.13381>
- Bettencourt, E. M., Bettencourt, C. M., Silva, J. C. e., Ferreira, P., Manito, C. I., Matos, C. M., Romão, R. J., & Rocha, A. (2008). Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. *Small Ruminant Research*, 74(1–3), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2007.05.001>
- Bettencourt, E. M. V., Bettencourt, C. M., Silva, J. N. C. E., Ferreira, P., de Matos, C. P., Oliveira, E., Romão, R. J., Rocha, A., & Sousa, M. (2009). Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved in vivo produced ovine embryos. *Theriogenology*, 71(6), 947–958. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.019>
- Bhat, M. H., Sharma, V., Khan, F. A., Naykoo, N. A., Yaqoob, S. H., Vajta, G., Khan, H. M., Fazili, M. R., Ganai, N. A., & Shah, R. A. (2015). Open pulled straw vitrification and slow freezing of sheep IVF embryos using different cryoprotectants. *Reproduction, Fertility and Development*, 27(8), 1175–1180. <https://doi.org/10.1071/RD14024>
- Bielanski, A., & Vajta, G. (2009). Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. In *Human Reproduction* (Vol. 24, Issue 10, pp. 2457–2467). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep117>
- Blanco, M. R., Simonetti, L., & Rivera, O. E. (2003). Embryo production and progesterone profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments. *Small Ruminant Research*, 47(3), 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00245-6](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00245-6)
- Bottrel, M., Hidalgo, M., Mogas, T., Pereira, B., Ortiz, I., Díaz-Jiménez, M., Consuegra, C., Morató, R., & Dorado, J. (2020). One-step warming does not affect the in vitro viability and cryosurvival of cryotop-vitrified donkey embryos. *Theriogenology*, 152, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.026>
- Brasil, O. O., Moreira, N. H., Santos, G., Silva, B. D. M., Mariante, A. S., & Ramos, A. F. (2016). Superovulatory and embryo yielding in sheep using increased exposure time to progesterone associated with a GnRH agonist. *Small Ruminant Research*, 136, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.005>
- Bruno-Galarraga, M., Cueto, M., Gibbons, A., Pereyra-Bonnet, F., Subiabre, M., & González-Bulnes, A. (2015). Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs. *Theriogenology*, 84(5), 784–790. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.011>
- Caamaño, J. N., Gómez, E., Trigal, B., Muñoz, M., Carrocera, S., Martín, D., & Díez, C. (2015). Survival of vitrified invitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology*, 83(5), 881–890. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.11.021>
- Chian, R. C., Son, W. Y., Huang, J. Y., Cui, S. J., Buckett, W. M., & Tan, S. L. (2005). High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertility and Sterility*, 84, S26, 2005. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.07.086>

- Cocero, M., Aguilar, B., Alabart, J. L., Olivera, J., & Folch, J. (2000). *FACTORES QUE AFECTAN AL RENDIMIENTO DE LA T.E. CONGELADOS EN EL PROGRAMA GENÉTICO DE OVIARAGON*. 760–762.
- Cognie, Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, *51*(1), 105–116. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00235-0)
- Contreras-Solis, I., Diaz, T., Lopez, G., Caigua, A., Lopez-Sebastian, A., & Gonzalez-Bulnes, A. (2008). Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. *Animal Reproduction Science*, *104*(1), 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.021>
- Cortés-Reyes, É., Rubio-Romero, J. A., & Gaitán-Duarte, H. (2010). Statistical methods for evaluating diagnostic test agreement and reproducibility. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, *61*(3), 247–255. <https://doi.org/10.18597/rcog.271>
- Crilly, J. P., Politis, A. P., & Hamer, K. (2017). Use of ultrasonographic examination in sheep veterinary practice. *Small Ruminant Research*, *152*(July), 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.12.021>
- Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., Pinczak, A., Barrera, N., Crispo, M., & Menchaca, A. (2018). Serum progesterone concentrations during FSH superstimulation of the first follicular wave affect embryo production in sheep. *Animal Reproduction Science*, *196*, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.011>
- Cueto, M. I., Gibbons, A. E., Pereyra-Bonnet, F., Silvestre, P., & González-Bulnes, A. (2011a). Effects of Season and Superovulatory Treatment on Embryo Yields in Fine-Wool Merinos Maintained Under Field Conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, *46*(5), 770–775. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01738.x>
- D'Alessandro, A. G., & Martemucci, G. (2016). Superovulatory response to gonadotrophin FSH/LH treatment and effect of progestin supplement to recipients on survival of transferred vitrified embryos in goats. *Theriogenology*, *85*(2), 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.038>
- Dalcin, L., Silva, R. C., Paulini, F., Silva, B. D. M., Neves, J. P., & Lucci, C. M. (2013). Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology*, *67*(2), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.012>
- de Araújo-Lemos, P. F. B., de Freitas Neto, L. M., de Melo, J. V., Moura, M. T., Lima, P. F., & Oliveira, M. a. L. (2014). Comparison of different cryoprotectant regimes for vitrification of ovine embryos produced in vivo. *Small Ruminant Research*, *119*(1–3), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.02.013>
- de Araújo-Lemos, P. F. B., Freitas Neto, L. M., Moura, M. T., Melo, J. V., Lima, P. F., & De Oliveira, M. A. L. (2015). Comparison of vitrification and conventional freezing for cryopreservation of caprine embryos. *Zygote*, *23*(4), 594–602. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000215>
- De Paula, W. B. M., Agip, A. N. A., Missirlis, F., Ashworth, R., Vizcay-Barrena, G., Lucas, C. H., & Allen, J. F. (2013). Female and male gamete mitochondria are distinct and complementary in transcription, structure, and genome function. *Genome Biology and Evolution*, *5*(10), 1969–1977. <https://doi.org/10.1093/gbe/evt147>

- Dobrinisky, J. R. (2001). Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future. *Theriogenology*, 56(1), 1333–1344. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00634-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00634-3)
- dos Santos-Neto, P. C., Cuadro, F., Barrera, N., Crispo, M., & Menchaca, A. (2017). Embryo survival and birth rate after minimum volume vitrification or slow freezing of in vivo and in vitro produced ovine embryos. *Cryobiology*, 78, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.08.002>
- dos Santos Neto, P. C., Vilariño, M., Barrera, N., Cuadro, F., Crispo, M., & Menchaca, A. (2015). Cryotolerance of Day 2 or Day 6 in vitro produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods. *Cryobiology*, 70(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.11.001>
- Elliott, G. D., Wang, S., & Fuller, B. J. (2017). Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, 74–91. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>
- Fernandez, J., Bruno- Galarraga, M. M., Soto, A. T., de la Sota, R. L., Cueto, M. I., Lacau, I. M., & Gibbons, A. E. (2018). Hormonal therapeutic strategy on the induction of accessory corpora lutea in relation to follicle size and on the increase of progesterone in sheep. *Theriogenology*, 105, 184–188. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.020>
- Figueira, L. M., Alves, N. G., Batista, R. I. T. P., Brair, V. L., Lima, R. R., Oliveira, M. E. F., Fonseca, J. F., & Souza-Fabjan, J. M. G. (2019). Pregnancy rate after fixed-time transfer of cryopreserved embryos collected by non-surgical route in Lacaune sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(11), 1493–1496. <https://doi.org/10.1111/rda.13550>
- Figueira, L. M., Alves, N. G., Maia, A. L. R. e. S., Souza-Fabjan, J. M. G. de, Batista, R. I. T. P., Morais, M. C. da C., Lima, R. R. de, Oliveira, M. E. F., & Fonseca, J. F. da. (2020). Embryo yield and quality are associated with progestogen treatment during superovulation protocol in lactating Lacaune ewes. *Theriogenology*, 155, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.004>
- Figueira, L. M., Alves, N. G., Souza-Fabjan, J. M. G., Oliveira, M. E. F., Lima, R. R., Souza, G. N., & Fonseca, J. F. (2020). Preovulatory follicular dynamics, ovulatory response and embryo yield in Lacaune ewes subjected to synchronous estrus induction protocols and non-surgical embryo recovery. In *Theriogenology* (Vol. 145). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.004>
- Fonseca, J. F., Oliveira, M. E. F., Brandão, F. Z., Batista, R. I. T. P., Garcia, A. R., Bartlewski, P. M., & Souza-Fabjan, J. M. G. (2019). Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: The Brazilian experience. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(1), 17–26. <https://doi.org/10.1071/RD18324>
- Forcada, F., Amer-Meziane, M. A., Abecia, J. A., Maurel, M. C., Cebrián-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T., Asenjo, B., Vázquez, M. I., & Casao, A. (2011). Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. *Theriogenology*, 75(4), 769–776. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.019>
- Forcada, F., Sánchez-Prieto, L., Casao, A., Palacín, I., Cebrián-Pérez, J. A., Muiño-Blanco, T., & Abecia, J. A. (2012). Use of laparoscopic intrauterine insemination associated with a simplified superovulation treatment for in vivo embryo production in sheep: A preliminary report. *Animal*

- Production Science*, 52(12), 1111–1116. <https://doi.org/10.1071/AN12129>
- García-Domínguez, X., Marco-Jiménez, F., Viudes-de-Castro, M. P., & Vicente, J. S. (2019). Minimally invasive embryo transfer and embryo vitrification at the optimal embryo stage in rabbit model. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(147). <https://doi.org/10.3791/58055>
- García, J. I., Noriega-Portella, L., & Noriega-Hoces, L. (2011). Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Human Reproduction*, 26(4), 782–790. <https://doi.org/10.1093/humrep/der008>
- García Kako Rodríguez, M., Serpa Maciel, G., Ramirez Uscategui, R. A., Correia Santos, V. J., Perecin Nociti, R., Del Aguila da Silva, P., Rossi Feliciano, M. A., Zandonadi Brandão, F., Ferreira Fonseca, J., & Franco Oliveira, M. E. (2019). Early luteal development in Santa Inês ewes superovulated with reduced doses of porcine follicle-stimulating hormone. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(3), 456–463. <https://doi.org/10.1111/rda.13374>
- Gibbons, A., Cueto, M. I., & Pereyra Bonnet, F. (2011). A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 95(1), 61–64. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.08.007>
- Gibbons, Alejandro, Bruno-Galarraga, M., Fernandez, J., Gonzalez-Bulnes, A., & Cueto, M. (2019). Vitrified embryo transfer in Merino sheep under extensive conditions. *Animal Reproduction*, 16(2), 297–301. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0108>
- Gomes Bergstein-Galan, T., Romualdo Weiss, R., Kozicki, L. E., Bortoleto, C. T., Santana, N., Lara, S., & Aschenbrenner, G. A. (2020). *EFFECT OF FLUNIXIN MEGLUMINE AND hCG AT COMMERCIAL PROGRAMS FOR MULTIPLE OVULATION AND EMBRYO TRANSFER (MOET) IN SHEEP (Efeito do flunixin meglumine e hCG em programas comerciais de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) em ovinos)* (Issue 1). www.ser.ufpr.br/veterinary
- González-Bulnes, A., Baird, D. T., Campbell, B. K., Cocero, M. J., García-García, R. M., Inskip, E. K., López-Sebastián, A., McNeilly, A. S., Santiago-Moreno, J., Souza, C. J. H., & Veiga-López, A. (2004). Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 421–435. <https://doi.org/10.1071/RD04033>
- Gratwohl, A. (2010). ThomasTM Hematopoietic Cell Transplantation. In *European Journal of Haematology* (Vol. 84, Issue 1, pp. 95–95). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01360.x>
- Green, R., Santos, B., Sicherle, C., Landim-Alvarenga, F., & Bicudo, S. (2009). Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(3), 406–410. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01088.x>
- Grizelj, J., Vince, S., Samardžija, M., de Bulnes, A. G., Dovenski, T., Turmalaj, L., & Ževrnja, B. (2013). Use of ultrasonography to detect ovarian response in goats submitted to multiple ovulation and embryo transfer program. *Veterinarski Arhiv*, 83(2), 125–134.
- Ha, A. N., Lee, S. R., Jeon, J. S., Park, H. S., Lee, S. H., Jin, J. I., Sessions, B. R., Wang, Z., White, K. L., & Kong, I. K. (2014). Development of a modified straw method for vitrification of in vitro-produced bovine blastocysts and various genes expression in between the methods. *Cryobiology*, 68(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.11.007>

- Hamawaki, A., Kuwayama, M., & Hamano, S. (1999). Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology*, *C(4)*, 38.
- Herrera-Camacho, J., Aké-López, J. R., Ku-Vera, J. C., Williams, G. L., & Quintal-Franco, J. A. (2008). Respuesta ovulatoria, estado de desarrollo y calidad de embriones de ovejas Pelibuey superovuladas suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados. *Tecnica Pecuaria En Mexico*, *46(2)*, 107–117.
- Hosseini, S. M., Asgari, V., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Piryaei, A., Najarasl, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2012). Potential applications of sheep oocytes as affected by vitrification and in vitro aging. *Theriogenology*, *77(9)*, 1741–1753. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.005>
- Inui, H., Mizuno, J., Kikuchi, E., Noguchi, K., Tanji, Y., Hamabata, M., Kotsuzumi, C., Komiyama, M., Noguchi, Y., & Tamura, M. (2019). Safer Vitrification of Mouse and Human Embryos Using the Novel Cryoroom Vitrification System for Assisted Reproductive Technology. *Cryo Letters*, *40(1)*, 1–10.
- Isachenko, V., Folch, J., Isachenko, E., Nawroth, F., Krivokharchenko, A., Vajta, G., Dattena, M., & Alabart, J. L. (2003). Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology*, *60(3)*, 445–452. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00039-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00039-6)
- Juárez-Pérez, A., Domínguez-Rebolledo, Á., Pinzón-López, L., Aguilar-Urquizo, E., Ortíz-de la Rosa, B., & Ramón-Ugalde, J. P. (2018). Embriones ovinos vitrificados mediante una técnica “one step” producidos en dos estaciones. *Agroproductividad*, *11*, 121–126. <https://doi.org/https://doi.org/10.32854/agrop.v11i10.1255>
- Khunmanee, S., Tharasanit, T., Suwimonteerabutr, J., Panyaboriban, S., Techakumphu, M., & Swangchan-Uthai, T. (2020). On-farm lambing outcomes after transfer of vitrified and slow frozen embryos. *Animal Reproduction Science*, *216*, 106467. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106467>
- Kopeika, J., Thornhill, A., & Khalaf, Y. (2015). The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: Principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human Reproduction Update*, *21(2)*, 209–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu063>
- Kruse, S. (2012). *Vitrification of in-vitro and in vivo- produced bovine embryos for direct transfer* (Vol. 3, Issue September) [Colorado State University]. <https://doi.org/10.19641/j.cnki.42-1290/f.2012.03.022>
- Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*, *67(1)*, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.014>
- Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., & Leibo, S. P. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, *11(3)*, 300–308. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60837-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60837-1)
- Lane, M., Schoolcraft, W. B., Gardner, D. K., & Phil, D. (1999). Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*, *72(6)*, 1073–1078. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00418-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00418-5)
- Ledda, S., Kelly, J. M., Nieddu, S., Bebbere, D., Ariu, F., Bogliolo, L., Natan, D., & Arav, A. (2019).

- High in vitro survival rate of sheep in vitro produced blastocysts vitrified with a new method and device. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0390-1>
- Leibo, S. P., & Pool, T. B. (2011). The principal variables of cryopreservation: Solutions, temperatures, and rate changes. *Fertility and Sterility*, 96(2), 269–276. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.06.065>
- Li, Q. Y., Guan, H., Hou, J., An, X. R., & Chen, Y. F. (2008). Technical note: Transfer of ovine embryos through a simplified mini-laparotomy technique. *Journal of Animal Science*, 86(11), 3224–3227. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-0846>
- 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)
- Loiola Filho, J. B., Monte, A. P. O. do, Souza, T. T. D. S., Miranda, M. D. S., Magalhães, L. C., Barros, C. H. S. C., Silva, A. A. D. A., Santos, A. O., Guimarães, A. D. S. L., Costa, J. M. da S., Cruz, R. B., Cordeiro, M. F., & Lopes Júnior, E. S. (2015). Effect of pFSH dose reduction on in vivo embryo production in Dorper ewes. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(6Supl2), 4215. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2015v36n6sup2p4215>
- López, J. S., Ramón-Ugalde, J. P., Barroso-Padilla, J. de J., Gutiérrez-Gutiérrez, A. M., Fierro, R., & Piña-Aguilar, R. E. (2013). Superovulation, in vivo embryo recovery and cryopreservation for Aoudad (*Ammotragus lervia*) females using osmotic pumps and vitrification: A preliminary experience and its implications for conservation. *Tropical Conservation Science*, 6(1), 149–157. <https://doi.org/10.1177/194008291300600105>
- Luna-Palomera, C., Macías-Cruz, U., & Sánchez-Dávila, F. (2019). Superovulatory response and embryo quality in Katahdin ewes treated with FSH or FSH plus eCG during non-breeding season. *Tropical Animal Health and Production*, 51(5), 1283–1288. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01801-9>
- Maciél, G. S., Rodriguez, M. G. K., Santos, V. J. C., Uscategui, R. A. R., Nociti, R. P., Maronezi, M. C., Oliveira, C. S., Feliciano, M. A. R., Vicente, W. R. R., da Fonseca, J. F., & Oliveira, M. E. F. (2019). Follicular dynamics and in vivo embryo production in Santa Inês ewes treated with smaller doses of pFSH. *Animal Reproduction Science*, 209(February), 106137. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106137>
- Marco-Jiménez, F., Jiménez-Trigos, E., Almela-Miralles, V., & Vicente, J. S. (2016). Development of cheaper embryo vitrification device using the minimum volume method. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148661>
- Martínez-Rojero, R., Mejía-Villanueva, O., Zarco-Quintero, L., Mastache-Lagunas, A., Reyna-Santamaría, L., Martínez-Rojero, R., Mejía-Villanueva, O., Zarco-Quintero, L., Mastache-Lagunas, A., & Reyna-Santamaría, L. (2017). Evaluación de un protocolo de superovulación para transferencia de embriones en ovejas Criollas de la Montaña de Guerrero./ Evaluation of a superovulation protocol for embryo transfer in Creole ewes from the Guerrero Mountain. *Abanico Veterinario*, 7(3), 30–36. <https://doi.org/10.21929/abavet2017.73.3>

- Martinez, A. G., & Matkovic, M. (1998). CRYOPRESERVATION OF OVINE EMBRYOS: SLOW FREEZING AND VITRIFICATION. *Theriogenology*, *49*(1084), 1039–1049.
- Martino, A., Songsasen, N., & Leibo, S. P. (1996). Development into Blastocysts of Bovine Oocytes Cryopreserved by Ultra-Rapid Cooling¹. *Biology of Reproduction*, *54*(5), 1059–1069. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.5.1059>
- Massip', A., Van Der Zwalm, P., Scheffen, B., & Ectors, F. (1989). Some Significant Steps in the Cryopreservation of Mammalian Embryos with a Note on a Vitrification Procedure 2. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 19).
- Matsumoto, H., Jiang, J. Y., Tanaka, T., Sasada, H., & Sato, E. (2001). Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, *42*(2), 139–144. <https://doi.org/10.1006/cryo.2001.2309>
- Mayorg, I., Maraa, L., Sannaa, D., Stellettab, C., Morganteb, M., Casua, S., & Dattenaa, M. (2011). Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. *Theriogenology*, *75*(9), 1661–1668. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.029>
- Maza-Ramos, N. S., Martínez-Tinajero, J. J., Izaguirre-Flores, F., Aguirre-Medina, J. F., Ley de Coss, A., & Martínez-Priego, G. (2017). PRODUCCION, CALIDAD Y DESARROLLO DE EMBRIONES EN OVEJAS PELIBUEY ALIMENTADAS CON *Clitoria ternatea* L., EN CONDICIONES TROPICALES. *AGROProductividad*, *10*(2), 72–78.
- Meikle, M. N., Schlapp, G., Menchaca, A., & Crispo, M. (2018). Minimum volume Spatula MVD vitrification method improves embryo survival compared to traditional slow freezing, both for in vivo and in vitro produced mice embryos. *Cryobiology*, *84*, 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.07.005>
- Meraï, A., Dattena, M., Casu, S., Rekik, M., & Lassoued, N. (2017). High-milking sheep have a lower ovulation rate and tend to yield fewer embryos in response to superovulation and intrauterine artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, *52*(5), 814–818. <https://doi.org/10.1111/rda.12983>
- Merry, D. A., Bondioli, K. R., Allen, R. L., & Wright, R. W. (1984). One-step sucrose dilution of frozen-thawed sheep embryos. *Theriogenology*, *22*(4), 433–443.
- Momozawa, K., Matsuzawa, A., Tokunaga, Y., Abe, S., Koyanagi, Y., Kurita, M., Nakano, M., & Miyake, T. (2017). Efficient vitrification of mouse embryos using the Kitasato Vitrification System as a novel vitrification device. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *15*(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-017-0249-2>
- Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 10314–10331. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13138>
- Morató, R., & Mogas, T. (2014). New device for the vitrification and in-straw warming of in vitro produced bovine embryos. *Cryobiology*, *68*(2), 288–293. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.010>
- Mpebe, N. A., Gonzalez-Bulnes, A., & Lehloenya, K. C. (2018). Effect of breed and follicular status on response to superovulation in south african goats. *Journal of Applied Animal Research*, *46*(1), 141–145. <https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1277530>

- Navarrete-Sierra, L. F., Cruz-Tamayo, A. A., González-Parra, E. I., Piña-Aguilar, R. E., Sangines-García, J. R., Toledo-López, V., & Ramón-Ugalde, J. P. (2008). Efecto de la aplicación de la hormona de crecimiento recombinante (rbST) sobre la respuesta superovulatoria y la viabilidad embrionaria en ovejas de pelo. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 18(2), 175–179.
- Oliveira, M. E.F., Bartlewski, P. M., Jankowski, N., Padilha-Nakaghi, L. C., Oliveira, L. G., Bicudo, S. D., Fonseca, J. F., & Vicente, W. R. R. (2017). Relationship of antral follicular blood flow velocity to superovulatory responses in ewes. *Animal Reproduction Science*, 182, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.04.009>
- Oliveira, M. E.F., Fonseca, J. F., Vicente, W. R. R., Rodrigues, N. N., Vergani, G. B., Souza-Fabjan, J. M. G., Jamieson, M., Cristescu, A., Murawski, M., & Bartlewski, P. M. (2019). Are the spectral Doppler indices of ovarian arteries indicative of antral follicular development and predictive of ovulatory responses and embryo yields in superovulated ewes? *Reproductive Biology*, 19(4), 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2019.11.004>
- Oliveira, M. E.F., Zambrini, F. N., Souza-Fabjan, J. M. G., Bartlewski, P. M., Guimarães, J. D., Brandão, F. Z., & Fonseca, J. F. (2020). Repeated trans-cervical embryo recoveries in Santa inês ewes subjected to short- or long-term superovulatory treatment regimens. *Animal Reproduction Science*, 217. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106469>
- Oliveira, Maria E.F., Feliciano, M. A. R., D'Amato, C. C., Oliveira, L. G., Bicudo, S. D., Fonseca, J. F., Vicente, W. R. R., Visco, E., & Bartlewski, P. M. (2014). Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. *Animal Reproduction Science*, 144(1–2), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.10.012>
- Ortega, R. M. M., Pendás, L. C. T., Ortega, M. M., Abreu, A. P., & Cánovas, A. M. (2009). El coeficiente de correlacion de los rangos de spearman caracterizacion. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, 8(2).
- Panagiotidis, Y., Vanderzwalmen, P., Prapas, Y., Kasapi, E., Goudakou, M., Papatheodorou, A., Passadaki, T., Petousis, S., Nikolettos, N., Veletza, S., Prapas, N., & Maroulis, G. (2013). Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: A prospective randomized study. *Reproductive BioMedicine Online*, 26(5), 470–476. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.01.016>
- Panyaboriban, S., Suwimonteerabutr, J., Swangchan-Uthai, T., Tharasanit, T., Suthikrai, W., Suadsong, S., & Techakumphu, M. (2018). A simplified superovulation protocol using splitsingle administration of Folltropin®-V in hyaluronan: Application to purebred sheep. *Veterinarni Medicina*, 63(7), 321–328. <https://doi.org/10.17221/52/2016-VETMED>
- Paramio, M. T., & Izquierdo, D. (2014). Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(s4), 37–48. <https://doi.org/10.1111/rda.12334>
- Parmegiani, L., Cognigni, G. E., Bernardi, S., Cuomo, S., Ciampaglia, W., Infante, F. E., Tabarelli De Fatis, C., Arnone, A., MacCarini, A. M., & Filicori, M. (2011). Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(4), 505–512. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.07.003>
- Parmegiani, Lodovico, Accorsi, A., Bernardi, S., Arnone, A., Cognigni, G. E., & Filicori, M. (2012). A

- reliable procedure for decontamination before thawing of human specimens cryostored in liquid nitrogen: Three washes with sterile liquid nitrogen (SLN2). *Fertility and Sterility*, 98(4), 870–875. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.028>
- Passmore, L. A., & Russo, C. J. (2016). *Europe PMC Funders Group Specimen preparation for high-resolution cryo-EM*. 51–86. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.011>. Specimen
- Pereira, R. M., Mesquita, P., Batista, M., Baptista, M. C., Barbas, J. P., Pimenta, J., Santos, I. C., Marques, M. R., Vasques, M. I., Silva Pereira, M., Santos Silva, F., Oliveira Sousa, M. C., Fontes, C. M. G., Horta, A. E. M., Prates, J. A. M., & Marques, C. C. (2009). Doppel gene polymorphisms in Portuguese sheep breeds: Insights on ram fertility. *Animal Reproduction Science*, 114(1–3), 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.10.003>
- Prellwitz, L., Zambrini, F. N., Guimarães, J. D., de Sousa, M. A. P., Oliveira, M. E. F., Garcia, A. R., Esteves, S. N., Bartlewski, P. M., Souza-Fabjan, J. M. G., & Fonseca, J. F. (2019). Comparison of the intravenous and intravaginal route of oxytocin administration for cervical dilation protocol and non-surgical embryo recovery in oestrous-induced Santa Inês ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(9), 1230–1235. <https://doi.org/10.1111/rda.13499>
- Quan, F., Zhang, Z., An, Z., Hua, S., Zhao, X., & Zhang, Y. (2011). Multiple Factors Affecting Superovulation in Poll Dorset in China. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 39–44. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01551.x>
- Rebolledo, Á. D., Manzanero, G. V., Romero, A. A., Franco, J. Q., Rodriguez, J. B., Lorca, J. R., & Ugalde, J. R. (2017). Follicular population at the onset of a superovulatory treatment and ovarian response in hair ewes. *Romanian Biotechnological Letters*, 22(2), 12427–12431.
- Rodriguez-Villamil, P., Ongaratto, F. L., Fernandez Taranco, M., & Bó, G. A. (2014). Solid-surface vitrification and in-straw dilution after warming of in vitro-produced bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), 79–84. <https://doi.org/10.1111/rda.12229>
- Romão, R., Bettencourt, E., Pereira, R. M. L. N., Marques, C. C., Baptista, M. C., Barbas, J. P., Oliveira, E., Bettencourt, C., & Sousa, M. (2016). Ultrastructural Characterization of Fresh and Vitrified In Vitro- and In Vivo-Produced Sheep Embryos. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 45(3), 231–239. <https://doi.org/10.1111/ahe.12191>
- Romão, R., Marques, C. C., Baptista, M. C., Barbas, J. P., Horta, A. E. M., Carolino, N., Bettencourt, E., & Pereira, R. M. (2015). Cryopreservation of invitro-produced sheep embryos: Effects of different protocols of lipid reduction. *Theriogenology*, 84(1), 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.02.019>
- Sang, T. S., Sung, K. J., Hong, S. Y., Ok, K. L., Yhong, H. S., Won, I. C., Doo, S. L., Gwan, S. L., Jong, K. C., & Young, W. L. (2008). Laparoscopy vs. laparotomy for embryo transfer to produce transgenic goats (*Capra hircus*). *Journal of Veterinary Science*, 9(1), 103–107. <https://doi.org/10.4142/jvs.2008.9.1.103>
- Saragusty, J., & Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141(1), 1–19. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0236>
- Shi, J. M., Yi, J. Y., Tian, X. Z., Wang, F., Lian, Z. X., Han, H. Bin, Fu, J. C., Lv, W. F., & Liu, G. S. (2015). Effects of seasonal changes on the ovulation rate and embryo quality in superovulated Black Suffolk ewes. *Neuroendocrinology Letters*, 36(4), 330–336.

- Simonetti, L., Forcada, F., Rivera, O. E., Carou, N., Alberio, R. H., Abecia, J. A., & Palacin, I. (2008). Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Animal Reproduction Science*, 104(2–4), 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.01.020>
- Skidmore, J. A., Schoevers, E., & Stout, T. A. E. (2009). Effect of different methods of cryopreservation on the cytoskeletal integrity of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) embryos. *Animal Reproduction Science*, 113(1–4), 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.07.006>
- Stringfellow, D. A., & Givens, D. (2010). *Manual of the International Embryo Transfer Society* (D. A. Stringfellow & M. D. Givens (eds.); 4th editio, p. 202).
- Stubbs, C., Bailey, T. L., Murray, K., & Gibson, M. I. (2020). Polyampholytes as Emerging Macromolecular Cryoprotectants. *Biomacromolecules*, 21(1), 7–17. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01053>
- Sun, X., Li, Z., Yi, Y., Chen, J., Leno, G. H., & Engelhardt, J. F. (2008). Efficient Term Development of Vitrified Ferret Embryos Using a Novel Pipette Chamber Technique¹. *Biology of Reproduction*, 79(5), 832–840. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.067371>
- Talwar, P., & Prakash, V. (2015). Vitrification in Assisted Reproduction. *Vitrification in Assisted Reproduction*, 51–63. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-1527-1>
- Taniguchi, M., Ikeda, A., Arikawa, E., Wongsrikeao, P., Agung, B., Naoi, H., Nagai, T., & Otoi, T. (2007). Effect of cryoprotectant composition on in vitro viability of in vitro fertilized and cloned bovine embryos following vitrification and in-straw. *Journal of Reproduction and Development*, 53(4), 963–969. <https://doi.org/10.1262/jrd.18175>
- Torres-Zapata, S., Luna-Palomera, C., Aguilar-Cabrales, J. A., Peralta-Torres, J. A., Aké-López, J. R., Sánchez-Dávila, F., & Abad-Zavaleta, J. (2016). Ovulatory response and embryo quality in Katahdin ewes supplemented with palm oil. *South African Journal of Animal Sciences*, 46(3), 261–268. <https://doi.org/10.4314/sajas.v46i3.5>
- Torres, S., & Sevellec, C. (1987). Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reproduction Nutrition Developpement*, 27(4), 859–863. <https://doi.org/10.1051/rnd:19870612>
- Truong, T. T., & Gardner, D. K. (2020). Antioxidants increase blastocyst cryosurvival and viability post-vitrification. *Human Reproduction*, 35(1), 12–23. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez243>
- Tsang, W. H., & Chow, K. L. (2009). Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *BioTechniques*, 46(7), 550–552. <https://doi.org/10.2144/000113125>
- Vajta, G., Murphy, C. N., & Machaty, Z. (1999). In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the method. *Veterinary Record*, 144, 180–181.
- Vajta, Gábor, & Nagy, Z. P. (2006). Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive Biomedicine Online*, 12(6), 779–796. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61091-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61091-7)
- Varago, F. C., Moutacas, V. S., Carvalho, B. C., Serapião, R. V., Vieira, F., Chiarini-Garcia, H., Brandão, F. Z., Camargo, L. S., Henry, M., & Lagares, M. A. (2014). Comparison of conventional freezing and vitrification with dimethylformamide and ethylene glycol for cryopreservation of ovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(5), 839–844.

- <https://doi.org/10.1111/rda.12376>
- Vargas Reyes, J. N., & Chacón Jaramillo, L. (2016). Cryopreservation method and composition of the vitrification solution affect viability of in vitro bovine embryos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 29(2), 130–137. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v29n2a06>
- Viana, J. (2019). Embryo Technology Newsletter. *Embryo Technology Newsletter*, v.36, n.4, 2019, 36(4).
- Willadsen, S. M., Polge, C., Rowson, L. E. A., & Moor, R. M. (1976). Deep freezing of sheep embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 46(1), 151–154. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0460151>
- Yavin, S., & Arav, A. (2007). Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, 67(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.029>
- Youngs, C. R. (2011). Cryopreservation of preimplantation embryos of cattle, sheep, and goats. *Journal of Visualized Experiments*, 54, 2–5. <https://doi.org/10.3791/2764>
- Yu, X. L., Deng, W., Liu, F. J., Li, Y. H., Li, X. X., Zhang, Y. L., & Zan, L. S. (2010). Closed pulled straw vitrification of in vitro-produced and in vivo-produced bovine embryos. *Theriogenology*, 73(4), 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.004>
- Zhou, Y., Fu, X., Zhou, G., Jia, B., Fang, Y., Hou, Y., & Zhu, S. (2014). An efficient method for the sanitary vitrification of bovine oocytes in straws. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-19>

Anexo: Carta Comité Bioética

Comité de Bioética
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Sede Bogotá



Bogotá D.C., 2 de agosto de 2016

[CB-081-16]

Doctora
CLAUDIA JIMÉNEZ ESCOBAR
Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia
Investigadora principal

Apreciada Doctora Jiménez,

El Comité de Bioética en sesión del 28 de junio de 2016, Acta 06, luego de la revisión de la documentación y aclaraciones referentes al siguiente proyecto, y acordó emitir el respectivo concepto, así:

Proyecto	"Efecto del protocolo de vitrificación y sistemas de empaque sobre la tasa de supervivencia de embriones ovinos obtenidos in vivo".
Investigador principal	Prof. Claudia Jiménez Escobar. FMVZ-UN
Estudiante	Daniel Fernando González Mendoza. Maestría en Salud Animal - FMVZ-UN.
Concepto	AVALADO

Es importante tener en cuenta que este concepto sólo aplica para los procedimientos en las condiciones y con las características indicadas en el formato final y documentos presentados. El investigador deberá informar sobre cualquier cambio que se proponga incluir y que esté relacionado con la ubicación, el cuidado y bienestar de los animales, estas modificaciones no podrán ejecutarse sin el aval previo del Comité; así mismo, se debe dar aviso sobre cualquier situación imprevista que se considere implique algún riesgo para los animales o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.

Agradezco su atención.

Cordialmente,


LUCÍA BOTERO ESPINOSA
Coordinadora
Comité de Bioética