



## Tasa de preñez post vitrificación en los embriones de équidos producidos *in vivo*. Revisión



Christian Urías-Castro <sup>a\*</sup>

Ana Myriam Boeta <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Boulevard San Ángel S/N, Fraccionamiento San Benito, Predio Las Coloradas, Culiacán Sinaloa, México.

<sup>b</sup> Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Reproducción . Ciudad de México, México.

\*Autor de correspondencia: [cesar.urias@uas.edu.mx](mailto:cesar.urias@uas.edu.mx)

### Resumen:

La vitrificación es un método de criopreservación que se utiliza a menudo con los embriones que se obtienen de yeguas o de burras. Consiste en la drástica reducción de la temperatura a niveles cercanos a los  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  lo cual causa que la solución criopreservadora que contiene el embrión pase del estado líquido al vítreo. Varias mejoras en los protocolos de vitrificación han hecho posible criopreservar embriones de diferentes tamaños. Los embriones recolectados al sexto día después de la ovulación (DO) suelen tener un diámetro menor o igual a 300 micrómetros ( $\leq 300\text{ }\mu\text{m}\varnothing$ ) y se pueden vitrificar de forma rutinaria siguiendo protocolos simples. Las tasas de preñez post vitrificación (TPPV) son más altas con embriones pequeños que con los grandes ( $>300\text{ }\mu\text{m}\varnothing$ ). Las TPPV elevadas en los embriones  $\leq 300\text{ }\mu\text{m}\varnothing$  se debe a que la cápsula embrionaria (CE) aún no está completamente desarrollada y desde luego tiene una alta permeabilidad a las soluciones criopreservadoras. Los embriones recolectados en el séptimo u octavo día DO son  $>300\text{ }\mu\text{m}\varnothing$  y se caracterizan por tener una baja supervivencia post vitrificación. Para aumentar la TPPV con los embriones  $>300\text{ }\mu\text{m}\varnothing$  se puede perforar la CE para hacerla más permeable a las soluciones criopreservadoras, reducir su tamaño aspirando el fluido del blastocele e inducir un alto

índice de transferencia de temperatura para alcanzar con más rapidez la vitrificación a los -196 °C.

**Palabras clave:** Yeguas, Burras, Embrión, Criopreservación, Vitrificación, Tasa de preñez.

Recidido: 02/07/2019

Aceptado: 21/10/2019

## Introducción

Según estimaciones de la FAO<sup>(1)</sup>, durante el período 2007-2017 el número de burros (*Equus africanus asinus*) se redujo en países como Brasil (1'163,316 a 841,307), China (7'306,000 a 4'568,500), Ecuador (102,058 a 49,729), India (438,000 a 247,000) e Italia (24,000 a 20,928). La población de burros también ha disminuido en el continente africano debido a la demanda del mercado chino por productos como la piel de burro<sup>(2)</sup>. Sin embargo, en países como Italia<sup>(3)</sup> y Brasil<sup>(4)</sup> los burros forman una parte importante de la industria de los équidos por su producción de leche<sup>(5,6)</sup>, queso<sup>(7)</sup> y carne<sup>(4)</sup>. La recuperación de la población de burros es un asunto importante debido al papel que juegan en la economía de los países emergentes<sup>(8)</sup> y en la producción de animales híbridos como las mulas<sup>(9)</sup>. Los ciclos estrales de las burras y las yeguas (*Equus ferus caballus*) difieren principalmente en la duración del período del celo; el estro es de mayor duración en las burras<sup>(10)</sup>. Sin embargo, el intervalo entre la ovulación-fertilización y la entrada del embrión en el útero parece ser similar entre las burras<sup>(11,12,13)</sup> y las yeguas<sup>(14,15)</sup>. El tamaño del embrión recuperado durante el sexto, séptimo, octavo o noveno día después de la ovulación (DO) varía drásticamente tanto en las burras<sup>(12,13,16,17)</sup> como en las yeguas<sup>(15,16,18)</sup>, aunque la tendencia de aumentar en tamaño es similar entre ellas. En los équidos se sabe que el embrión ingresa al útero al sexto día DO<sup>(18)</sup>.

En el proceso de la recolecta de embriones en las burras y las yeguas para la preservación por vitrificación, el día DO seleccionado (día de la infusión intrauterina de soluciones y recolección) determina la etapa de desarrollo del embrión (mórula, blastocisto o blastocisto expandido). Desde luego, dicta el protocolo adecuado para optimizar la tasa de preñez post vitrificación (TPPV)<sup>(12,13,15,19-22)</sup>. Al infundir el embrión en el sexto DO, el embrión recuperado generalmente será de un tamaño menor que 300 micrómetros<sup>(12,16,21)</sup>, mientras que los embriones recolectados en el séptimo, octavo o noveno día DO tendrán un tamaño igual o mayor a 300 micrómetros<sup>(12,13,20,23,24)</sup>. Para optimizar los protocolos de vitrificación embrionaria se requiere de una determinación precisa del día de la ovulación (día cero) para calcular con exactitud la edad/etapa del embrión. Esto es vital porque los embriones recolectados durante el sexto día DO no requieren de una reducción en tamaño antes de la

vitricación, pero los recolectados el séptimo, octavo o el noveno día DO sí la requieren<sup>(12,21,25,26,27)</sup>.

Las biotecnologías como la vitricación de embriones podrían facilitar la reproducción en burras y promover la recuperación gradual de sus poblaciones. El objetivo del presente estudio fue generar información enfocada al mejoramiento del protocolo de la vitricación de embriones y un consecuente incremento de la TPPV para embriones >300  $\mu\text{m}\varnothing$  tanto en burras como en yeguas.

### **Relevancia del tamaño del embrión sobre la tasa de preñez post vitricación (TPPV)**

Durante los primeros diez años del Siglo XXI el tamaño del embrión que se utilizaba en el protocolo de vitricación afectaba claramente la TPPV, con los embriones pequeños ( $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$ ) resultando en tasas más altas y los grandes (>300  $\mu\text{m}\varnothing$ ) en tasas más bajas<sup>(15)</sup>. En yeguas se obtuvieron TPPV cercanas al 62 % usando embriones vitricados  $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$ <sup>(28)</sup>, mientras que las tasas eran de 10 % cuando se utilizaron embriones vitricados >300  $\mu\text{m}\varnothing$ <sup>(29)</sup>. A partir del 2010, se desarrollaron ajustes a los protocolos de criopreservación diseñados para embriones >300  $\mu\text{m}\varnothing$ . Entre ellos se encuentran la punción de la cápsula embrionaria (CE) y la reducción de su tamaño mediante la aspiración del fluido del blastocelo (FB)<sup>(23)</sup>. Estos ajustes permitieron la vitricación exitosa de embriones >300  $\mu\text{m}\varnothing$ , la supervivencia del embrión post vitricación en burras<sup>(30)</sup> y TPPV superiores al 40 % en yeguas<sup>(31)</sup>. No se han realizado investigaciones sobre el efecto del tamaño del embrión en la TPPV utilizando embriones derivados de burras<sup>(17,30)</sup>.

### **Asociación entre la permeabilidad de la capsula embrionaria (CE) y la tasa de preñez post vitricación (TPPV)**

En las especies équidas los embriones desarrollan una estructura glucoproteica denominada cápsula embrionaria (CE) la cual es necesaria para una adecuada progresión de la gestación<sup>(32)</sup>. La vitricación de los embriones derivados de las yeguas ha demostrado que la presencia de la CE disminuye la permeabilidad del embrión a soluciones criopreservadoras, tanto *in vitro*<sup>(33)</sup> como *in vivo*<sup>(34,35)</sup>. Una de las primeras preñeces exitosas en una yegua con embriones vitricados >300  $\mu\text{m}\varnothing$  se logró gracias al tratamiento de la CE con tripsina previo al proceso de vitricación para aumentar su permeabilidad a las criopreservados<sup>(36)</sup>. Sin embargo, el aumento en la permeabilidad de la CE por medio de la tripsina o los inhibidores de microfilamentos (citocalasina-B) no han producido resultados positivos de manera consistente<sup>(37)</sup>. En embriones equinos >300  $\mu\text{m}\varnothing$  el grado de integridad de la CE parece estar relacionado estrechamente con la TPPV. Este se debe a que la CE está mucho más desarrollada en esta categoría de embriones y cualquier alteración dramática de ella puede

reducir la TPPV<sup>(23)</sup>. Todavía faltan estudios sobre la permeabilidad de la CE en embriones de burra o mula y para determinar si la permeabilidad está asociada con la TPPV.

### **Punción de la capsula embrionaria (CE) y extracción del fluido del blastocele (FB) antes de la vitrificación**

En embriones equinos  $>300 \mu\text{m}\varnothing$  es importante perforar la CE<sup>(38)</sup> y extraer la FB para reducir su tamaño antes de proceder con la vitrificación<sup>(39)</sup>. Varios estudios han reportado un incremento en la TPPV como resultado de este procedimiento<sup>(23,24,31,38,40,41)</sup>. Por ejemplo, antes del 2010 las TPPV en las yeguas usando embriones  $>300 \mu\text{m}\varnothing$  eran inferiores al 40 %<sup>(15,29)</sup>, pero después del 2010 la aplicación de la punción de la CE y la reducción de su tamaño arrojó TPPV entre el 60 y el 80 %<sup>(23,24,40)</sup>. Hay pocos datos sobre la eficacia de este procedimiento en embriones derivados de burras. Un estudio reciente demostró que la reducción del tamaño del embrión por aspiración del FB antes de la vitrificación resultó en una tasa de supervivencia del embrión del 83 % post vitrificación<sup>(30)</sup>. Es importante notar que en este estudio no se transfirieron los embriones al útero de una burra posterior a la vitrificación y por lo tanto no se documentó el desarrollo del embrión *in vivo* ni la TPPV. Todavía está por determinar si la punción de la CE es necesaria en embriones  $>300 \mu\text{m}\varnothing$  derivados de burras<sup>(21,30)</sup>, ya que ningún estudio ha documentado aún el TPPV en embriones de burras después de la punción de la CE y la reducción del tamaño<sup>(16,17,21,30)</sup>. Cabe la posibilidad de que este procedimiento no sea necesario en los embriones de burras ya que un estudio de embriones de yegua y de burra demostró que los embriones de las burras parecían tolerar mejor la vitrificación<sup>(16)</sup>; no se han realizado estudios para probar directamente esta hipótesis. Son pocos los estudios que evalúan el TPPV en embriones de las burras<sup>(21)</sup> y es claro que se necesita más trabajo en esta área<sup>(16,17,21)</sup>.

### **La influencia de un incremento en el índice de transferencia de temperatura (ITT) sobre la tasa de preñez post vitrificación (TPPV) en embriones de équidos**

En équidos, un ITT elevado durante el proceso de vitrificación y desvitrificación mejora el TPPV de los embriones  $>300 \mu\text{m}\varnothing$ . Este índice está relacionado con la velocidad y la cantidad de la temperatura transferida del nitrógeno líquido (alrededor de  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a la solución criopreservadora que contiene el embrión (temperatura cercana a los  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Un aumento en el ITT representa un aumento en la velocidad a la cual la temperatura de la solución criopreservadora que contiene el embrión alcanza los  $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ . Hay diferentes maneras de promover un aumento en el ITT. Una es poner la solución criopreservadora con el embrión en contacto directamente con el nitrógeno líquido, y otra es reducir el volumen de la solución que se pondrá en contacto con el nitrógeno líquido. Recientemente se ha logrado un aumento en la supervivencia de los embriones post vitrificación a niveles

superiores al 60 % tanto en yeguas<sup>(23,40)</sup> como en burras<sup>(17)</sup> por medio de un aumento del ITT y utilizando volúmenes de soluciones criopreservadoras inferiores a un microlitro al sumergir el embrión en el nitrógeno líquido. En otro estudio la TPPV se incrementó en yeguas en respuesta al uso de la punción de la CE, un aumento del ITT y el uso de contenedores de volumen pequeño (<1 µl), pero bajó cuando se usó un ITT reducido y contenedores de volumen grande (≥1 µl)<sup>(40)</sup>. En teoría el uso de contenedores de pequeño volumen aumenta el ITT. Un estudio de embriones derivados de burras apoya esta suposición ya que al usar un volumen final de la solución de vitrificación <1 µl se incrementó la supervivencia del embrión post vitrificación entre un 40 y 50 %<sup>(17)</sup>. No se estableció la TPPV en este estudio ya que no se realizó la punción de la CE ni se transfirieron los embriones al útero de una burra.

## Agradecimientos

La presente revisión de literatura forma parte de las investigaciones financiadas por el Proyecto PROFAPI2015/287.

## Literatura citada:

1. FAO, 2018 Statistical Database Website, Food and Agriculture Organization. Rome Italy (Home page: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>).
2. Cox L. Dramatic decline in donkey populations blamed on consumer demand for 'ejiao'. *Vet Rec* 2017;(181):610.
3. Camillo F, Rota A, Biagini L, Tesi M, Fanelli D, Panzani D. The current situation and trend of donkey industry in Europe. *J Equine Vet Sci* 2018;(65):44-49.
4. Carneiro GF, Lucena JE, de Oliveira Barros L. The current situation and trend of the donkey industry in South America. *J Equine Vet Sci* 2018;(65):106-110.
5. Monti G, Bertino E, Muratore MC, Coscia A, Cresi F, Silvestro L, *et al.* Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an *in vivo* and *in vitro* study. *Pediatr Allergy Immunol* 2007;(3):258-264.
6. Licitra R, Li J, Liang X, Altomonte I, Salari F, Yan J, *et al.* Profile and content of sialylated oligosaccharides in donkey milk at early lactation. *LWT* 2019;(115):108437.
7. D'Alessandro AG, Martemucci G, Loizzo P, Faccia M. Production of cheese from donkey milk as influenced by addition of transglutaminase. *J Dairy Sci* 2019;16615.
8. Getachew AM, Trawford AF, Feseha G, Reid SWJ. Gastrointestinal parasites of working donkeys in Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 2010;(42):27-33.

9. Vidament M, Vincent P, Martin FX, Magistrini M, Blesbois E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim Reprod Sci* 2009;(112):22-35.
10. Hagstrom D. Donkeys are different: an overview of reproductive variations from horses. 2004. <http://livestocktrail.illinois.edu/horsenet/paperDisplay.cfm?ContentID=7449> Accessed March 15, 2019.
11. Allen WR, Kydd J, Boyle MS, Antczak DF. Between-species transfer of horse and donkey embryos: A valuable research tool. *Equine Vet J* 1985;(17):53-62.
12. Vendramini OM, Bruyas JF, Fieni F, Battut I & Tainturier D. Embryo transfer in Poitou donkeys, preliminary results. *Theriogenology* 1997;(47):409.
13. Pérez-Marín CC, Vizuete G, Galisteo JJ. Embryo recovery results in Hispano-Arabe horse and Spanish donkey breeds. *Livestock Sci* 2017;(206):76-81.
14. Oguri N, Tsutsumi Y. Non-surgical egg transfer in mares. *Reproduction* 1974;(41):313-320.
15. Eldridge-Panuska WD, di Brienza VC, Seidel Jr GE, Squires EL, Carnevale EM. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology* 2005;(63):1308-1319.
16. Pérez-Marín CC, Vizuete G, Vazquez-Martinez R, Galisteo JJ. Comparison of different cryopreservation methods for horse and donkey embryos. *Equine Vet J* 2018;(50):398-404.
17. Bottrel M, Ortiz I, Pereira B, Díaz-Jiménez M, Hidalgo M, Consuegra R, *et al.* Cryopreservation of donkey embryos by the cryotop method: Effect of developmental stage, embryo quality, diameter and age of embryos. *Theriogenology* 2018;(125):242-248.
18. Freeman DA, Weber JF, Geary RT, Woods GL. Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology* 1991;(36):823-830.
19. McKinnon AO, Squires EL. Equine embryo transfer. *Vet Clin North Am Equine Prac* 1988;(2):305-333.
20. Silva PC, Oliveira JP, Dutra GA, Paiva SO, Caram DF, Junqueira RG, *et al.* Taxa de recuperação e características morfológicas de embriões muares (*Equus caballus* x *Equus asinus*). *Pesqui Vet Bras* 2018;(7):1453-1457.
21. Panzani D, Rota A, Romano C, Pratelli G, Sabatini C, Camillo F. Birth of the first donkey foals after transfer of vitrified embryos. *J Equine Vet Sci* 2012;(32):419.

22. Bottrel M, Fortes T, Ortiz I, Hidalgo M, Dorado J. Establishment and maintenance of donkey-in-mule pregnancy after embryo transfer in a non-cycling mule treated with oestradiol benzoate and long-acting progesterone. *Span J Agric Res* 2017;(4):10.
23. Diaz F, Bondioli K, Paccamonti D, Gentry GT. Cryopreservation of day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification. *Theriogenology* 2016;(85):894-903.
24. Wilsher S, Rigali F, Couto G, Camargo S, Allen WR. Vitrification of equine expanded blastocysts following puncture with or without aspiration of the blastocoele fluid. *Equine Vet J* 2018;(0):1-6.
25. Camillo F, Panzani D, Scollo C, Rota A, Crisci A, Vannozzi I, *et al.* Embryo recovery rate and recipients' pregnancy rate after nonsurgical embryo transfer in donkeys. *Theriogenology* 2010;(73):959-965.
26. Betteridge KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *J Anat* 1982;(135):191-209.
27. Iuliano MF, Squires EL, Cook VM. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *J Anim Sci* 1985;(60):258-263.
28. Campos-Chillon LF, Suh TK, Barcelo-Fimbres M, Seidel GE Jr, Carnevale EM. Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. *Theriogenology* 2009;(79):349-354.
29. Barfield JP, McCue PM, Squires EL, Seidel Jr GE. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos. *Cryobiology* 2009;(59):36-41.
30. Ottmann L, Reigner F, Allamellou JM, Magistrini M, Guignot F. Preimplantation genetic diagnosis in donkey embryos after biopsy. *J Equine Vet Sci* 2018;(66):195.
31. Ferris RA, McCue PM, Trundell DA, Morrissey JK, Barfield JP. Vitrification of large equine embryos following manual or micromanipulator-assisted blastocoele collapse. *J Equine Vet Sci* 2016;(41):64-65.
32. Stout TAE, Meadows S, Allen WR. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival *in vivo*. *Anim Reprod Sci* 2005;(87):269-281.
33. Gillard Kingma SE, Thibault ME, Betteridge KJ, Schlaf M, Gartley CJ, Chenier TS. Permeability of the equine embryonic capsule to ethylene glycol and glycerol *in vitro*. *Theriogenology* 2011;(76):1540-1551.

34. Legrand E, Krawiecki JM, Tainturier D, Corniere P, Delajarraud H, Bruyas JF. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? Proceedings of the 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph 2000;(3):62-65.
35. Scott BR, Carwell DB, Hill RA, Bondioli KR, Godke RA, Gentry GT. Evaluation of capsule permeability in the equine blastocyst. *J Equine Vet Sci* 2012;(32):795-798.
36. Legrand E, Bencharif D, Barrier-Battut I, Delajarraud H, Corniere P, Fieni F, *et al.* Comparison of pregnancy rates for days 7-8 equine embryos frozen in glycerol with or without previous enzymatic treatment of their capsule. *Theriogenology* 2002;(58):721-723.
37. Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, McCue PM, Seidel Jr GE, Squires EL. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin. *Theriogenology* 2002;(58):717-720.
38. Guignot F, Blard T, Barrière P, Gasgogne T, Gaude Y, Yvon JM, *et al.* Easy, quick and cheap technique to cryopreserve Welsh B pony blastocyst. *J Equine Vet Sci* 2016;(41):53-60.
39. Choi YH, Velez IC, Riera FL, Roldán JE, Hartman DL, Bliss SB, *et al.* Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology* 2011;( 76):143-152.
40. Sánchez R, Blanco M, Weiss J, Rosati I, Herrera C, Bollwein H, *et al.* Influence of embryonic size and manipulation on pregnancy rates of mares after transfer of cryopreserved equine embryos. *J Equine Vet Sci* 2017;(49):54-59.
41. Guignot F, Reigner F, Perreau C, Tartarin P, Babilliot JM, Bed'hom B, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis in Welsh pony embryos after biopsy and cryopreservation. *J Anim Sci* 2015;(93):5222-5231.