

Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería de las Tecnologías de
Telecomunicación

Estudio del rendimiento de un sistema de
vitrificación cerrado basado en altas velocidades de
recalentamiento: viabilidad en embrión de ratón

Autor: Miriam del Rocío Sumariva Soto

Tutor: Ramón de Jesús Risco Delgado

Dpto. de Física Aplicada
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2020







Trabajo Fin de Grado
Grado en Ingeniería de las Tecnologías de
Telecomunicación

**Estudio del rendimiento de un sistema de
vitrificación cerrado basado en altas velocidades
de recalentamiento: viabilidad en embrión de
ratón**

Autor:

Miriam del Rocío Sumariva Soto

Tutor:

Ramón de Jesús Risco Delgado

Profesor titular

Dpto. de Física Aplicada

Escuela Técnica Superior de Ingeniería

Universidad de Sevilla

Sevilla, 2020





Trabajo Fin de Grado: Estudio del rendimiento de un sistema de vitrificación cerrado basado en altas velocidades de recalentamiento: viabilidad en embrión de ratón

Autor: Miriam del Rocío Sumariva Soto

Tutor: Ramón de Jesús Risco Delgado

El tribunal nombrado para juzgar el Proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Sevilla, 2020

El Secretario del Tribunal





Agradecimientos

Han pasado muchos años desde que comencé mis estudios en Ingeniería , los cuales han sido muy duros para mí, pero hoy que culmina esta etapa académica quisiera agradecer a todos los que lo han hecho posible.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis padres su esfuerzo, dedicación y confianza plena en mí durante todo este largo camino, gracias a ellos hoy día soy quién soy. Gracias por no dejarme bajar los brazos jamás. Agradecer a mi hermana, por sus palabras de aliento cuando todo se me complicaba, gracias por hacerme ver que yo si era capaz de culminar toda esta etapa. También quiero hacer una mención especial a mi compañero de vida. Gracias por aguantar mi mal humor, mis llantos etc, sin ti no hubiera sido capaz de continuar y levantarme tantísimas veces, gracias por ver en mis ojos más de lo que veo yo misma. Y por último me gustaría agradecer a mi tutor Ramón Risco Delgado toda la paciencia y dedicación puestas en este trabajo.

Y para concluir quiero dedicar unas palabras a mí misma. Cree más en ti y de todo lo que puedes lograr, porque con trabajo y constancia sí eres capaz de todo.





Índice de contenidos

1. Resumen.....	13
2. Introducción.....	15
2.1. Introducción a la criobiología.....	15
2.2. La criopreservación.....	16
2.2.1. Principios físicos-químicos de la congelación.....	16
2.2.2. Respuesta celular ante la congelación y descongelación.....	18
2.2.3. Agentes crioprotectores (CPA).....	21
2.3. Métodos de criopreservación.....	22
2.3.1. Congelación lenta.....	23
2.3.2. Vitrificación.....	24
2.3.2.1. Fundamentos de la vitrificación.....	24
2.3.2.2. Soportes de vitrificación.....	25
2.3.2.3. Factores determinantes en el desarrollo de un sistema de vitrificación cerrado y eficiente.....	29
2.4. Daños biológicos.....	31
2.5. Aplicaciones.....	31
2.6. Información adicional sobre el instrumento de medida para el experimento, el ratón. 32	
3. Objetivos.....	37
3.1. Objetivo general.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
4. Material y métodos.....	39
4.1. Localización.....	39
4.2. Material animal.....	39
4.3. Manejo animal.....	40
4.4. Diseño experimental.....	43
4.4.1. Protocolo de producción de embriones.....	43
4.4.2. Protocolo de criopreservación.....	44
4.4.2.1. Vitrificación.....	46
4.4.2.2. Recalentamiento.....	47
4.5. Material instrumental.....	49



5. Resultados.....	59
6. Conclusión.....	75
7. Bibliografía.....	77
8. Anexos.....	83

Índice de tablas

Tabla 1. Resultados semana 1. Recepción de 30 muestras FVB*FVB.....	61
Tabla 2. Resultados semana 2. Recepción de 29 muestras FVB*FVB.....	62
Tabla 3. Resultados semana 3. Recepción de 20 muestras FVB*FVB.....	63
Tabla 4. Resultados semana 4. Recepción de 20 muestras FVB*FVB.....	64
Tabla 5. Resultados semana 5. Recepción de 30 muestras FVB*CD-1.....	65
Tabla 6. Resultados semana 6. Recepción de 20 muestras FVB*FVB.....	66
Tabla 7. Resultados semana 7. Recepción de 30 muestras FVB*CD-1.....	67
Tabla 8. Resultados semana 8. Recepción de 32 muestras FVB*FVB.....	68
Tabla 9. Resultados semana 9. Recepción de 31 muestras FVB*CD-1.....	69
Tabla 10. Resultados semana 10. Recepción de 18 muestras FVB*CD-1.....	70
Tabla 11. Resultados semana 11. Recepción de 33 muestras FVB*FVB.....	71
Tabla 12. Resultados semana 12. Recepción de 20 muestras FVB*FVB.....	72
Tabla 13. Tasa de supervivencia y de recuperación tras el procedimiento de desvitrificación..	73



Índice de ilustraciones

Ilustración 1: Diagrama de una disolución acuosa.....	17
Ilustración 2: Membranas celulares.	18
Ilustración 3: Eventos físicos y lesiones criogénicas de las células durante la congelación y descongelación.	20
Ilustración 4: Comparación entre los métodos de congelación lenta y vitrificación.	22
Ilustración 5: Soporte Cryoleaf.....	26
Ilustración 6: Soporte Cryotop.	26
Ilustración 7: Soporte Cryotip.....	27
Ilustración 8: Soporte Open pulled straw.....	27
Ilustración 9: Esquema detallado del dispositivo SafeSpeed y sus componentes.	28
Ilustración 10: Vista frontal de la selladora SafeSealer.	30
Ilustración 11: Estudios publicados de vitrificación de embriones y blastocitos en diferentes estados de desarrollo.....	32
Ilustración 12: Condiciones para la manipulación.....	33
Ilustración 13: Desarrollo embrionario en el ratón.....	34
Ilustración 14: Visión de una mórula.....	35
Ilustración 15. Centro de producción y experimentación animal.	39
Ilustración 16: Ratón de laboratorio.	40
Ilustración 17: Distribución de las muestras biológicas en la placa.	41
Ilustración 18: Estimulación ovárica y obtención de embriones.	44
Ilustración 19: Sujeción de la ratona con mano izquierda.	44
Ilustración 20: Incubadora DH DURAFLOW AUTOMATIC.	49
Ilustración 21: Bomba de oxígeno.....	49
Ilustración 22. Dispositivo de medición independiente (Labotect/ InControl 1050).....	50



Ilustración 23. Dispositivo SafeSpeed.....	50
Ilustración 24. Gasas estériles.....	50
Ilustración 25. Agua desionizada.....	51
Ilustración 26. Sistema de agua.....	51
Ilustración 27. Termómetro.....	51
Ilustración 28: Nitrógeno líquido.....	52
Ilustración 29. Temporizador.	52
Ilustración 30: Termo de acero inoxidable.....	53
Ilustración 31. Medios SafeSpeed.	53
Ilustración 32. Vinoteca.....	54
Ilustración 33. Placa de Petri FALCON de 35 mm.....	54
Ilustración 34. Sistema de aspiración.....	55
Ilustración 35. Selladora manual.....	55
Ilustración 36: Tijeras de acero inoxidable.....	55
Ilustración 37. Pletina calefactora SBS OSAKA II PK 312.	56
Ilustración 38. Estereomicroscopio URA Technic.....	56
Ilustración 39. Micropipeta NICHIPET EXII 0-200 μ l.....	56
Ilustración 40. Puntas amarillas GILSON 2-200 μ l.	57
Ilustración 41. Pipetas Pasteur no estériles.	57



1. Resumen.

La finalidad de este estudio de investigación ha sido estudiar el rendimiento de un portador de vitrificación cerrado, SafeSpeed, diseñado bajo el nuevo paradigma de vitrificación en el cual una alta velocidad de recalentamiento juega un papel esencial, utilizando embriones procedentes del ratón para examinar la viabilidad de obtener una supervivencia alta después de la vitrificación.

El dispositivo de vitrificación usado consistió en una pajuela principal donde las muestras se cargaban por aspiración, además se pudo sellar herméticamente antes de sumergirlo en nitrógeno líquido y posteriormente calentarse en un baño de agua tibia a 37 °C.

En dicho proyecto se han realizado 12 ensayos repartidos semanalmente donde en cada uno de los ensayos ha existido dos grupos:

- Grupo I: grupo control o fresco que se corresponde a las muestras que no fueron criopreservadas y se dejaban en cultivo embrionario para observar su desarrollo morfológico.
- Grupo II: grupo experimental que se corresponde a las muestras a las que se le aplicó nuestra técnica de criopreservación.

Además, en cada ensayo se realizaron los siguientes controles y análisis:

- Análisis del desarrollo morfológico de las muestras biológicas de ambos grupos.
- Análisis de la supervivencia morfológica de las muestras biológicas de ambos grupos.
- Mortalidad de las muestras biológicas.

En términos generales se podría señalar que se encontraron resultados similares en ambos grupos (tasa de supervivencia del 74.8% en el grupo control vs tasa de supervivencia del 74.5% en el grupo experimental), así que concluimos que se obtuvieron resultados muy esperanzadores y en un futuro dicha técnica no solo se convertirá en una herramienta fundamental en la práctica clínica, sino que también podrá emplearse en una amplia gama de sectores, así como para lograr la extinción de determinadas especies, escasez de productos en determinadas estaciones etc.



Abstract.

The purpose of this research study has been to investigate the efficiency of a closed Vitrification holder, SafeSpeed, designed under the new paradigm of vitrification in which a high overheating speed plays an essential role, using embryo from a mouse to examine the viability to obtain a high survival after vitrification.

The vitrification device used consisted of a main straw where the samples were loaded by suction. Apart from that, it could be shut hermetically before being immersed in liquid nitrogen and subsequently being heated in a bath of warm water at 37 degrees.

In such a project twelve weekly distributed tests have been carried out and in each of them, two groups have existed:

- Group I: control group that corresponds to the samples which were not cryopreserved and were left in embryo culture to observe its morphological development.
- Group II: experimental group that corresponds to the samples to which our cryopreservation technique was applied.

Furthermore, the next controls and analysis were made in each test:

- Analysis of the morphological development of the biological samples in each group.
- Analysis of the morphological survival of the biological samples in each group.
- Mortality of the biological samples.

On the whole, it could be pointed out that similar results were found in each group (a survival rate of 74.8% in the control group vs a survival rate of 74.5% in the experimental group). To conclude very promising results were obtained and in a future such a technique will not only become an essential tool in clinical practice, but it will be able to be employed in a wide range of sectors, as well as to achieve the extinction of certain species, product shortages in certain seasons...



2. Introducción.

2.1. Introducción a la criobiología.

La palabra criobiología deriva de la palabra griega *kryos*, *bios* y *logos* que significan frío, vida y ciencia, de modo que criobiología significa literalmente la ciencia de la vida a temperaturas heladas (1). La criobiología es la rama de la Biología que estudia los procesos biológicos que ocurren durante la exposición de material biológico como células, órganos, tejidos y seres vivos a bajas temperaturas (2).

Los primeros intentos de conservación de material biológico usando el frío se remontan a la antigüedad, concretamente fue el filósofo Hipócrates quien recomendó su uso para detener el sangrado y la hinchazón, pero no fue hasta 1949 cuando un grupo de científicos dirigidos por Christopher Polge consiguió realizar análisis metódicos mediante la criopreservación de espermatozoides de toro, lo que desencadenó el amplio uso de la criopreservación de células, tejidos y órganos en la actualidad (1). Los primeros estudios sobre la congelación exitosa de embriones de ratón fueron publicados en 1972 por D. Whittingham, S. Leibo y P. Mazur y en 1983 Trounson y Mohr publicaron su trabajo sobre el primer embarazo en humanos logrado con embriones criopreservados (3). En 1984 Rall y Fahy (4) lograron la primera vitrificación exitosa de embriones mamíferos, específicamente en ratones.

La criopreservación es el procedimiento que permite preservar material biológico a muy baja temperatura para que puedan ser almacenados y conservados durante un tiempo indefinido sin alterar su viabilidad. Para ello se almacenan a -196°C en nitrógeno líquido donde toda la actividad metabólica se detiene. No obstante, trabajar a estas temperaturas provoca una alteración en los procesos biológicos normales desencadenando en una reducción de la membrana celular, poniendo en riesgo la integridad estructural de la célula, así que si la congelación no se realiza de forma controlada ocasionará daños letales. Los daños asociados a la criopreservación se deben a dos tipos de procesos, la formación de hielo intracelular y la alta concentración de solutos debido a la precipitación del agua en forma de hielo. La formación de hielo intracelular se produce cuando la congelación se realiza demasiado rápido, atrapando el agua en el interior celular, y la elevada concentración de solutos cuando la congelación se realiza demasiado lenta. Para evitar la formación de hielo en el interior de la célula es necesario previamente deshidratarla lo máximo posible, de modo que para conseguirlo se añaden al medio de congelación soluciones crioprotectoras que sustituyen el agua que sale de la célula por crioprotector. En función de la capacidad de atravesar la membrana celular por difusión pasiva que tienen los crioprotectores se distinguen dos tipos, crioprotectores permeables y no permeables. (2)



Actualmente existen dos métodos de criopreservación, congelación lenta y vitrificación. “En el sistema de congelación lenta, la temperatura desciende aproximadamente de 0,3 a 2 °C por minuto en un medio con concentraciones bajas de crioprotectores (por ejemplo, glicerol 1,5M) hasta -30 a -80 °C. De esta manera las células tienen tiempo suficiente para eliminar exceso de líquido (deshidratarse) y equilibrarse con el medio” (2 p16). En cuanto a la vitrificación es un proceso de solidificación que utiliza soluciones altamente concentradas que implica la formación de vidrio en lugar de cristales de hielo en el interior de las células. “Durante este proceso el agua llega al estado sólido (vítreo) sin pasar por la formación de cristales. Esto se logra por medio de una congelación ultra-rápida (>1000 °C/min) y el uso de altas concentraciones de crioprotectores. Las células son deshidratadas, antes de la congelación, colocándolas en altas concentraciones de un crioprotector (> 6M)” (2 p16). Con el método de vitrificación se consigue eliminar la formación de hielo intracelular en cambio presenta un inconveniente, la toxicidad a la que están expuestas las muestras biológicas debido al uso de altas concentraciones de crioprotector, es por ello que para evitar dicho problema se debe controlar en forma muy precisa la concentración del medio crioprotector, la temperatura y el tiempo (2).

2.2. La criopreservación.

2.2.1. Principios físicos-químicos de la congelación.

“El proceso de congelación conlleva cambios físicos y químicos a nivel de la célula que pueden alterar la fisiología de ésta, llegando a ocasionarle daños incluso letales (5)” (6 p2). Sin embargo, es posible reducir estos daños mortales y mejorar la supervivencia celular gracias a los avances conseguidos en los protocolos de congelación. Para conseguir la viabilidad de células congeladas, es necesario pues un buen conocimiento de los principios físicos que rigen la criobiología: descenso crioscópico y ósmosis (6).

- Descenso crioscópico.

El descenso crioscópico es la disminución de la temperatura del punto de congelación de una disolución respecto a la temperatura del disolvente puro, es decir que al añadir soluto bajamos el punto de congelación de la disolución. El descenso crioscópico es una de las propiedades coligativas ya que sólo depende de la naturaleza del disolvente y de la cantidad de partículas del soluto (concentración del soluto) pero no de la naturaleza química de este último, es decir, el descenso crioscópico no guarda



ninguna relación con el tamaño ni con cualquier otra propiedad de los solutos, dicho de otra forma, cualquier soluto en la misma cantidad producirá el mismo efecto. (7)

El descenso crioscópico se puede expresar como:

$$\Delta T \approx \frac{R \cdot (T_f)^2}{\Delta H_f} \cdot x_B$$

Donde ΔT es el descenso crioscópico, T_f la temperatura de fusión, x_B la fracción molar del soluto presente y ΔH_f la entalpía de fusión, así que el descenso crioscópico es directamente proporcional a la molalidad (número de moles de soluto que contiene un kilogramo de disolvente) (8).

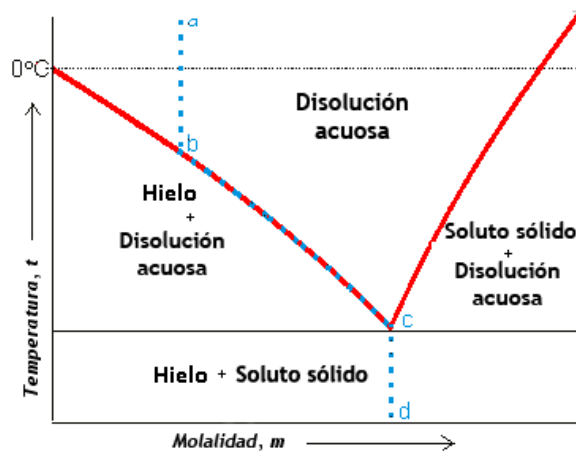


Ilustración 1: Diagrama de una disolución acuosa.

Fuente: (7).

En la figura podemos observar como a medida que aumenta la molalidad y la concentración de la disolución, disminuye la temperatura de congelación siguiendo una curva descendente (7).

- Presión osmótica.

La ósmosis es la difusión pasiva a través de una membrana semipermeable, la cual está formada por poros de tamaño minúsculo, lo que provoca que solo puedan atravesarla las partículas pequeñas y no grandes, es decir, esta membrana semipermeable actúa como una barrera de control que regula la entrada y salida de moléculas al medio extracelular, permitiendo el paso solo a moléculas de disolvente e impidiéndoselo a las moléculas de solutos. Esto hace que la difusión de las moléculas de disolvente sea desde la disolución de menor concentración de solutos, disolución hipotónica, a la de mayor concentración, disolución hipertónica, hasta alcanzar un equilibrio entre las dos distribuciones conocida como disolución isotónica. (9)



La presión osmótica es la cantidad de presión necesaria para detener completamente el proceso de ósmosis, dicho de otra forma, es la presión que se debe aplicar a una solución para detener el flujo de disolvente a través de la membrana semipermeable (9).

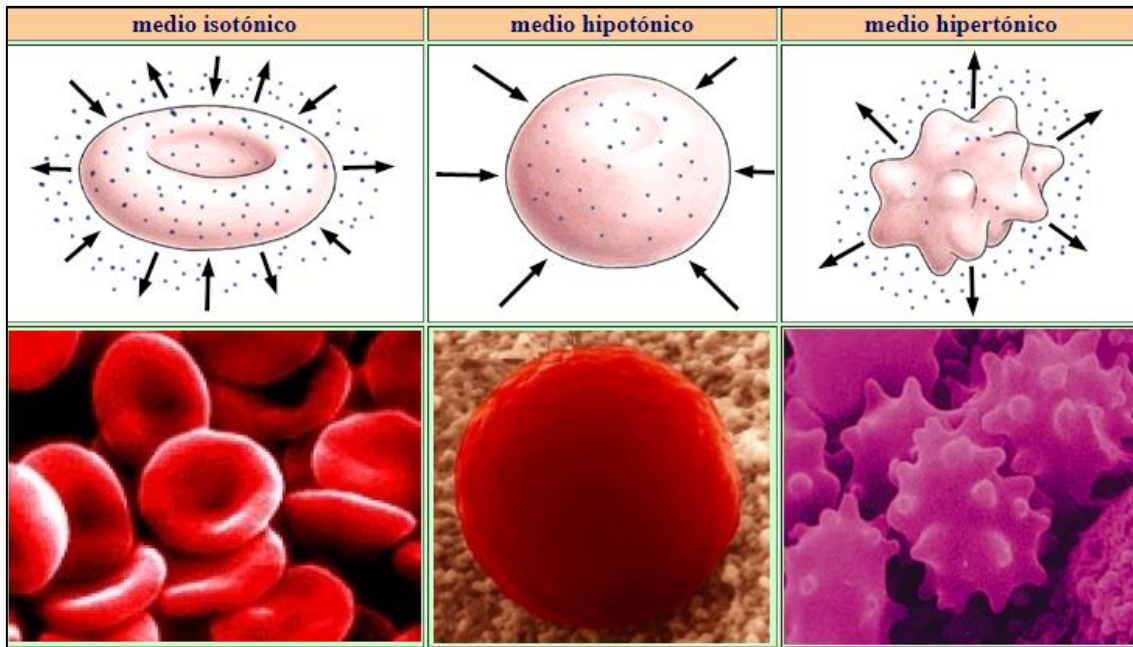


Ilustración 2: Membranas celulares.

Fuente: (9).

En la figura podemos ver las variaciones de volumen que sufren las células ocasionadas por el fenómeno de ósmosis. Al sumergir las células en un medio hipertónico, es decir, con una mayor concentración de solutos extracelular, se produce la difusión de agua hacia el exterior produciéndose una deshidratación y reducción del volumen de la célula, en cambio, al sumergirla en un medio hipotónico, es decir, con una menor concentración de solutos extracelular, se origina la difusión de agua hacia el interior produciéndose una hinchazón e incremento del volumen de la célula. En el caso de medio isotónico, no se produce difusión, ya que la concentración de solutos es igual en el interior y exterior celular, es decir, se encuentra en equilibrio. (9)

2.2.2. Respuesta celular ante la congelación y descongelación.

“La criopreservación de material biológico tiene lugar usualmente en una solución acuosa con diferentes solutos presentes. Las propiedades físico-químicas que rigen los eventos a los cuales están sometidas la solución durante la congelación derivan de la concentración de solutos disueltos en ella (10)” (11 p1). Para entender



cómo actúan las células a la congelación en una solución acuosa hay que tener en cuenta que el ambiente intracelular es también una solución acuosa ya que el agua constituye alrededor del 80% del volumen de la célula. La solución acuosa intracelular está separada de la solución acuosa extracelular por una membrana plasmática semipermeable que actúa como barrera de control para evitar la cristalización y permitir el equilibrio osmótico. Por lo tanto, la supervivencia criobiológica durante el ciclo de congelación como de descongelación reside en la capacidad de respuesta osmótica de la célula y en el destino del agua intracelular (6).

A bajas temperaturas (entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$), cuando en una solución acuosa hay solutos presentes, aumenta el descenso crioscópico, es decir, se produce un descenso del punto de congelación, de modo que en dicha solución se comenzará a crear cristales de hielo con una temperatura menor a la necesaria para congelar el agua pura (0°C), lo que conlleva a un sobre-enfriamiento de la muestra (12). Con este descenso de la temperatura el medio extracelular se cristaliza formándose hielo puro, de modo que a medida que el cambio de fase avanza, es decir, de líquido a sólido, los solutos quedan progresivamente más concentrados en la región extracelular, en otras palabras, habrá mayor concentración de solutos en el espacio extracelular que en el espacio intracelular (11). En respuesta a esa diferencia de gradiente que se genera entre el medio intracelular y extracelular, se ocasiona una evacuación de agua desde la región con menor concentración de solutos a la región con mayor concentración de solutos, o sea desde la región intracelular a la extracelular a través de la membrana semipermeable con lo cual la célula se deshidratará para así mantener el equilibrio osmótico con un medio extracelular cada vez más hipertónico (13). Precisamente es el hielo extracelular quien rompe el equilibrio isotónico natural ya que cuando se forma hielo en el exterior celular, simultáneamente se está produciendo un aumento de la concentración de solutos, así que la formación de hielo extracelular tiene como consecuencia la difusión de agua desde el espacio intracelular al extracelular, proceso conocido como deshidratación celular. Además, es la deshidratación de la región intracelular la que conlleva posteriormente un aumento en la concentración de solutos en el interior lo que provoca a su vez un descenso en el punto de congelación. Sin embargo, en estos momentos gracias a la naturaleza semipermeable de la membrana, no se formará cristales de hielo en el interior y además se sabe que “la probabilidad de iniciar la nucleación en el medio intracelular es mucho menos que en el medio extracelular ya que la nucleación está directamente relacionada con el tamaño del compartimiento a congelar (13)” (14).

Una vez iniciada la formación de hielo extracelular y la deshidratación en el medio intracelular la velocidad de enfriamiento será la variable que determine las alteraciones que se puedan llegar a ocasionar en el interior de la célula (13, 15). Si la velocidad de enfriamiento es muy lenta dará lugar a una elevada concentración de



solutos en la región extracelular con lo cual la deshidratación en el interior será máxima pudiéndose llegar al colapso celular, en cambio si la velocidad de enfriamiento es rápida provocará la formación de hielo intracelular ya que la célula no es capaz de deshidratarse lo suficientemente rápido (16-18). En cambio, existe una velocidad de enfriamiento óptima que minimiza el daño celular y alcanza un máximo en la probabilidad de supervivencia de las células a la criopreservación (5). Durante el proceso de congelación la membrana es la estructura que mayor daño sufre debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos y en consecuencia aumenta su fragilidad (19).

Cuando se descongela la solución y se produce el cambio de fase, en este caso de sólido a líquido, se reduce progresivamente la concentración de solutos en la región extracelular y de nuevo en respuesta a esa diferencia de gradiente se produce una evacuación de agua a través de la membrana desde el medio extracelular al intracelular así que la célula volverá a hidratarse para mantener el equilibrio osmótico, de modo que durante la descongelación se producen los cambios osmóticos inversos a los descritos para la congelación (14).

Los cristales que se generan en el medio intracelular con el proceso de congelación pueden crecer durante un proceso lento de descongelación produciéndose lo que se conoce como recrystalización, en cambio esto podría evitarse si se realiza un proceso rápido de calentamiento (20).

Tras todo lo descrito anteriormente se llega a la conclusión que el control de la cantidad y localización de los cristales de hielo constituye un gran desafío en la criobiología (12,21).

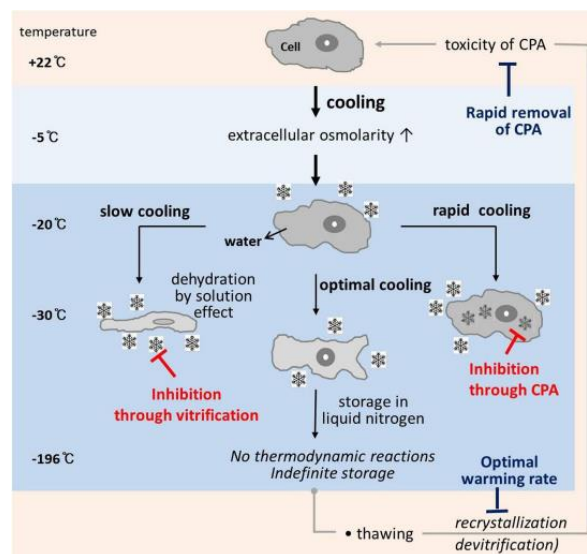


Ilustración 3: Eventos físicos y lesiones criogénicas de las células durante la congelación y descongelación.

Fuente: (22).



2.2.3. Agentes crioprotectores (CPA).

Para mejorar la viabilidad celular, además de una correcta velocidad de enfriamiento, es necesario modificar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la criopreservación. Para ello se añade al medio de congelación agentes crioprotectores, los cuales son sustancias muy hidrosolubles y de baja toxicidad que promueven una rápida deshidratación celular, o sea, aumenta la concentración de solutos en el medio intracelular, así pues será más complicado que se congele el agua interior de la célula ya que a mayor concentración de soluto mayor descenso del punto de congelación, por tanto el uso de estos agentes alterará el comportamiento de congelación de las células (23).

En función de la permeabilidad celular se distinguen dos tipos de agentes:

- Crioprotectores permeables: son sustancias de bajo peso molecular que penetran en el interior de las células y las protegen de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta. Debido a su bajo peso pueden atravesar la membrana celular y actuar provocando la deshidratación reemplazando las moléculas de agua por las del crioprotector evitando así el estrés osmótico. Al iniciarse el proceso de congelación las moléculas de crioprotector no se congelan en forma de hielo, sino que se solidifican formando una sustancia amorfa de consistencia vidriosa. Lo más empleados son: 1,2-Propanodiol (PROH), Dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol (EG) y glicerol. (6)

El crioprotector glicerol fue descubierto en 1949 por Polge, Smith y Parkes (24) y fue el aditivo más efectivo hasta que en 1959 se descubrió el efecto del crioprotector DMSO por Lovelock y Bishop (25). El glicerol se usa sobre todo para el almacenamiento de bacterias y esperma animal (26) y el DMSO para la criopreservación de células de mamíferos cultivadas (25) y ambos pueden actuar tanto dentro como alrededor de la célula a cualquier temperatura, en cambio se ha comprobado que DMSO presenta menor tasa de supervivencia debido a la metilación del ADN lo cual crea algunas dificultades para usarlo en aplicaciones clínicas (22).

- Crioprotectores no permeables: son sustancias de alto peso molecular que actúan en el exterior de las células y son efectivas cuando se utilizan velocidades altas de congelación. Estos crioprotectores no penetran en la célula así que ejercen su función crioprotectora promoviendo una rápida deshidratación celular reduciendo la probabilidad de formación de hielo intracelular. Los más empleados son: sacarosa, dextrosa, glucosa, polivinil. pirrolidona (PVP), dextrano y polietilenglicol (PEG). (11)



El uso de agentes crioprotectores aporta muchos beneficios como dilución de los electrolitos, disminución de la concentración del agua, aumento de la viscosidad, efecto coligativo, en resumen, reducen la cantidad de hielo formado a una determinada temperatura y por tanto la concentración de solutos durante la congelación y así la deshidratación celular. No obstante, estos agentes también presentan desventajas ya que pueden llegar a ser muy dañinos cuando son empleados especialmente en grandes concentraciones. Algunos de estos problemas son toxicidad, ósmosis y cambios en la permeabilidad al agua de la membrana plasmática. (14)

2.3. Métodos de criopreservación.

Actualmente existen dos protocolos de congelación para criopreservar muestras biológicas, congelación lenta y vitrificación, siendo las concentraciones de CPA y velocidad de enfriamiento utilizadas la principal diferencia entre ambas técnicas. En la ilustración podemos observar otras diferencias significativas (22):

Característica	Procedimiento	
	Congelación lenta	Vitrificación
Tiempo de trabajo	Más de 3 h	Rápido, menos de 10 min.
Costo	Se necesita una máquina de congelación costosa	Barato, no se necesita una máquina especial
Volumen de muestra (µL)	100-250	1-2
Concentración de CPA	Bajo	Alto
Riesgo de lesiones por congelamiento, incluida la formación de cristales de hielo.	Alto	Bajo
Viabilidad post-descongelamiento	Alto	Alto
Riesgo de toxicidad de CPA	Bajo	Alto
Estado del sistema	Solo sistema cerrado	Sistema abierto o cerrado
Posible contaminación con agentes patógenos.	Bajo	Alto
Habilidad de manipulación	Fácil	Difícil

Ilustración 4: Comparación entre los métodos de congelación lenta y vitrificación.

Fuente: (22).



2.3.1. Congelación lenta.

El objetivo de la congelación lenta es crear un delicado balance entre la nucleación de hielo, la concentración de crioprotectores empleados y la velocidad de enfriamiento para provocar hielo extracelular, pero evitar hielo intracelular el cual resulta letal para las muestras biológicas (27). La congelación lenta es una técnica de criopreservación de equilibrio osmótico donde los organismos biológicos son expuestos gradualmente a bajas concentraciones de crioprotectores, exponiéndolos posteriormente a un descenso lento de la temperatura realizado en sistemas de enfriamiento programables controlando las velocidades de enfriamiento. Para alcanzar el equilibrio osmótico se produce una rápida difusión del agua que da lugar a una deshidratación de la célula y posterior reducción de su tamaño el cual se recupera con la entrada del crioprotector en el interior celular (5), así pues, para que dicha deshidratación se pueda llevar a cabo correctamente se debe usar una velocidad de enfriamiento extremadamente lenta (6).

El descenso de la temperatura se inicia a temperatura ambiente de $-2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, pero la aparición de los primeros cristales de hielo en el medio extracelular, conocido como seeding, no se produce hasta que no se alcanza los $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (28), momento en el cual dicha cristalización comienza a propagarse lentamente a toda la solución (6). “El calor liberado con la siembra de hielo, favorece la deshidratación de las células, contribuyendo así a minimizar la cantidad de agua atrapada en el citoplasma y por tanto reduciendo la probabilidad de formación de hielo intracelular” (29 p26), dicho de otro modo, a dicha temperatura no se formará hielo intracelular debido a la alta concentración de solutos en el interior que provocan un descenso del punto de congelación.

Tras el seeding, el descenso de temperatura tiene lugar a una velocidad extremadamente lenta (aproximadamente $-0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) para la correcta difusión de los crioprotectores y el mínimo estrés osmótico posible, en cambio si el descenso de la temperatura es rápido, podría provocar la formación de hielo intracelular debido a una deshidratación insuficiente. Se puede concluir por tanto que el éxito de esta técnica reside en conseguir un adecuado balance entre la proporción de agua que sale de las células y la que se convierte en hielo. (6)

La congelación lenta ha sido la técnica de elección para embriones desde los inicios de la criopreservación, siendo aplicada con mínimas modificaciones y ofreciendo resultados altamente satisfactorios de supervivencia y gestación clínica. Estos buenos resultados conllevaron el uso de la congelación lenta para congelar ovocitos (30,31) pero desafortunadamente los resultados no fueron eficaces debido a la estructura y características del ovocito humano. El ovocito es una célula de gran tamaño con $150\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro aproximadamente, con gran cantidad de agua y una



ratio superficie-volumen muy baja (32) de manera que ante una congelación lenta se produce una deshidratación máxima que conlleva cambios en su forma esférica, alteraciones en su citoesqueleto (33,34), zona pelúcida y gránulos corticales (17,35). Sin embargo, desde sus orígenes se han logrado progresos en la criopreservación de ovocitos gracias a la mejora de crioprotectores usados y velocidad de descenso (31,36,37) e incluso algunos grupos han publicado resultados extraordinarios (38-42) con tasas de supervivencia del 80%, pero debido a la enorme variabilidad para reproducir esos resultados clínicos se ha desarrollado otro procedimiento alternativo conocido como vitrificación. (6)

2.3.2. Vitrificación.

2.3.2.1. Fundamentos de la vitrificación.

La vitrificación es una técnica de criopreservación ultrarrápida donde las muestras biológicas son expuestas a elevadas concentraciones de crioprotector, donde a diferencia de la técnica de congelación lenta, no es necesario alcanzar el equilibrio osmótico entre el medio extracelular e intracelular durante el periodo de enfriamiento de las células (6). Esta técnica emplea el nitrógeno líquido como solución criogénica y fue descubierta hace 50 años por C. Polge y J. Lovelock (24,43).

Durante el proceso de vitrificación se produce la solidificación de la solución acuosa sin la formación de cristales tanto dentro como fuera de la célula, es decir, la transición de un estado líquido a un estado sólido de consistencia vidriosa (estado vítreo) sin producción de hielo intracelular y extracelular. La transición de líquido a la fase no cristalizada se consigue enfriando el líquido que contiene una elevada concentración de crioprotectores a una velocidad extremadamente alta, así que con este rápido descenso de la temperatura la viscosidad de la muestra aumenta en gran medida, hasta el punto en que las moléculas quedan totalmente inmovilizadas y el líquido se transforma a un estado vítreo en el que la cristalización no puede ocurrir (44).

La criopreservación exitosa de ovocitos usando dicha técnica ha sido posible desde hace relativamente poco tiempo ya que ha planteado serios inconvenientes, resultando más complicada la eliminación total de los cristales de hielo debido a la estructura de la célula. “Uno de los principales obstáculos iniciales para la aplicación rutinaria de la técnica era la exposición de los ovocitos, durante largos periodos de tiempo, a altas concentraciones de crioprotectores con la consiguiente citotoxicidad y estrés osmótico para ellos (45)”(6 p4). En consecuencia, para solucionar estos problemas se han realizado distintas modificaciones en los protocolos como reducción del tiempo de exposición, combinación de nuevos crioprotectores como el etilenglicol



y sacarosa o incluso pequeñas variaciones en la composición de los crioprotectores (6). Por el contrario, los inconvenientes que presentan los ovocitos disminuyen cuantiosamente en el caso de los embriones ya que al estar compuestos por varias células presentan una relación superficie-volumen bastante mayor, siendo este el motivo por el cual la vitrificación de embriones no ha supuesto serios problemas en la aplicación clínica llegando incluso a mejorar los resultados obtenidos con el método de congelación lenta (46).

Este método de criopreservación presenta numerosas ventajas como son la total eliminación de la formación de hielo o la disminución del daño causado por el enfriamiento, puesto que atraviesa la zona de temperatura de peligro que oscila entre +15 °C y -5 °C a velocidades de enfriamiento muy rápidas evitando así los efectos adversos del frío como son alteraciones en el citoesqueleto y contenido lipídico de la membrana (47,48). Por otro lado, a diferencia de la congelación lenta, este método permite mayor flexibilidad, se efectúa rápidamente, en pocos minutos, y elimina la necesidad de mantenimiento de equipos caros. Finalmente, gracias a las continuas mejoras en la técnica, se puede concluir que el método de vitrificación puede ser considerado la alternativa más eficiente al método de congelación lenta para vitrificar tanto ovocitos como embriones en día 3 y blastocitos, pues se han conseguido mejores resultados (49-53).

El presente proyecto está encaminado a solventar uno de los inconvenientes de la vitrificación, la toxicidad, que en ocasiones sufren las muestras biológicas a vitrificar debido al uso de altas concentraciones de crioprotector. Para ello se ha empleado una novedosa técnica (54) en la que, a través del uso de un sistema cerrado de mínimo volumen, concretamente capilares de policarbonato, se consigue mejorar la velocidad de enfriamiento, la transmisión de calor y reducir la concentración de crioprotector necesaria para una vitrificación óptima. Esta técnica se especificará en apartados posteriores.

2.3.2.2. Soportes de vitrificación.

Desde el inicio de la vitrificación se ha podido evidenciar una creciente variedad de técnicas, todas ellas en busca de lograr mejores niveles de supervivencia. Estas mejoras fueron encaminadas a conseguir disminuir la toxicidad que sufren los organismos biológicos a través de una reducción considerable del volumen de solución a vitrificar, aumentando las tasas de enfriamiento y/o calentamiento y reduciendo la concentración de crioprotector (6). Para ello se han diseñado diferentes soportes de vitrificación lo que conlleva a que actualmente los embriólogos se enfrenten al dilema de tener que elegir entre dos sistemas de vitrificación: abierto o cerrado (55).



“Según el paradigma de la vitrificación bajo el que fueron diseñados los sistemas abiertos (56,57), la eficacia de un portador de vitrificación depende principalmente de la velocidad de enfriamiento alcanzada (58,59)” (55 p1), de manera que, con el fin de maximizar tales velocidades de enfriamiento, estos dispositivos se sumergen directamente en el nitrógeno líquido (60). “Un inconveniente de este enfoque es la hipotética posibilidad de contaminación por microorganismos infecciosos presentes en el nitrógeno líquido, y el riesgo de contaminación cruzada entre muestras de pacientes” (55 p1). No obstante, en la práctica clínica, este sistema presenta resultados muy óptimos siendo discutible si hay una verdadera probabilidad de contaminación cruzada (61,57) . Estos sistemas de vitrificación abiertos pertenecen al grupo de técnicas de superficie. En estos dispositivos las muestras biológicas son cargadas junto al medio sobre una superficie directamente accesible del dispositivo y posteriormente se realiza la inmersión de estos dispositivos en el nitrógeno líquido. Algunos soportes de vitrificación abiertos son rejillas de microscopía electrónica, horquillas de fibra de nylon (62), técnicas con microgotas (63), Cryoloop (64), Cryoleaf (65), Cryotop (66) etc (29). El Cryotop es uno de los dispositivos más usados en los laboratorios. Fue desarrollado por Kuwayama y consiste en una fina lengüeta de polipropileno unida a un mango de plástico con paredes muy finas y volumen inferior a 0.1 μ l con lo que se permite disminuir la concentración de crioprotectores y maximizar la velocidad de enfriamiento (6).



Ilustración 5: Soporte Cryoleaf.

Fuente: Google imágenes.

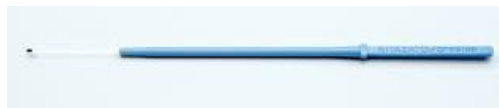


Ilustración 6: Soporte Cryotop.

Fuente: Google imágenes.



El nuevo paradigma de la vitrificación ha cambiado y muchos estudios han establecido que la velocidad de enfriamiento es de menos consecuencia para una vitrificación exitosa siendo la tasa de calentamiento la variable dominante e incluso por encima de la concentración de agentes crioprotectores. Dicho esto, para superar los problemas de bioseguridad de los sistemas abiertos se han cerrado los dispositivos de manera que se evita el contacto directo durante su inmersión en el nitrógeno líquido, así que ahora la idea central es lograr maximizar la tasa de calentamiento, no la de enfriamiento como en los sistemas abiertos. En la actualidad la eficacia de estos sistemas cerrados es aún un tema de debate (67,68,69,57). Estos sistemas de vitrificación cerrados pertenecen al grupo de técnicas de tubo. En estos dispositivos las muestras biológicas son cargadas junto al medio a través de una pieza tubular cilíndrica, y a diferencia de los abiertos, evitan el contacto directo con el nitrógeno líquido debido a un sellado por ambos extremos del tubo eliminando los posibles problemas de contaminación por contacto. Algunos soportes de vitrificación cerrados son open pulled straw (OPS) (70,71), closed pulled straw (72), Cryotip (modificación del Cryotop) (59), SafeSpeed (55) etc.



Ilustración 7: Soporte Cryotip.

Fuente: Google imágenes.



Ilustración 8: Soporte Open pulled straw.

Fuente: Google imágenes.



SafeSpeed es un portador de vitrificación cerrado diseñado por la empresa biotecnológica SafePreservation con el que además de conseguir altas tasas de enfriamiento se consiguen altas tasas de calentamiento. La reducción de volumen que supone este dispositivo respecto a otros contenedores, se traduce en una eficiente transferencia de calor, unas 20 veces (73).

Este sistema está compuesto por un capilar ultra fino de policarbonato ensamblado a una pajuela con 24 mm de diámetro y 135 mm de longitud. El dispositivo está formado por 4 partes (55):

1. Parte trasera.
2. Área de etiquetado.
3. Cubierta protectora transparente.
4. Capilar ultra fino.
 - 4.1. Marcas de colocación de las muestras.
 - 4.2. Marca de sellado.



Ilustración 9: Esquema detallado del dispositivo SafeSpeed y sus componentes.

Fuente: (55).

La parte trasera del dispositivo se puede conectar al sistema de aspiración para así cargar por aspiración las muestras biológicas dentro del capilar. Dichas muestras se situarán entre las marcas de colocación del capilar siendo ésta su posición final. A continuación, se sella el extremo del dispositivo y se desliza la cubierta protectora transparente, quedando listo para emergerlo en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para el calentamiento, se transfiere rápidamente del nitrógeno líquido a un recipiente de agua estéril a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. (55)

En nuestro trabajo estudiamos el rendimiento del dispositivo de vitrificación cerrado SafeSpeed, diseñado bajo el nuevo paradigma de la vitrificación que tienen Seki y Mazur desarrollado en sus últimas publicaciones en un modelo murino, empleando una técnica diseñada por D. Ramón Risco en la que se desea optimizar la velocidad de enfriamiento y calentamiento. Con este dispositivo y con la técnica puesta de manifiesto en el presente proyecto, logramos mayor velocidad de enfriamiento y recalentamiento (ambas en torno a $200.000\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) debido al pequeño



tamaño del soporte, una transferencia de calor más eficiente y eliminamos el riesgo de contaminación de las muestras biológicas durante su inmersión en el nitrógeno líquido debido al cierre hermético del sellado ofreciendo excelentes resultados, llegando incluso a tasas de recuperación del 100% (55). Estos resultados se detallarán en capítulos posteriores.

2.3.2.3. Factores determinantes en el desarrollo de un sistema de vitrificación cerrado y eficiente.

Para obtener un sistema de vitrificación cerrado y eficiente se han de tener en cuenta los siguientes factores (29):

1. Sellado hermético.

Este factor es un punto clave para el correcto desarrollo de la técnica que hemos empleado ya que un sellado inadecuado puede provocar la explosión del dispositivo, para ello hemos usado la selladora SafeSealer, la cual se encarga de sellar la zona de carga del dispositivo SafeSpeed. Con dicho sellado conseguimos que las muestras biológicas que están dentro del capilar no se contaminen tras sumergirlas en el nitrógeno líquido, ya que este mecanismo consigue que las muestras queden aisladas herméticamente tanto en el proceso de congelación como de descongelación. Nuestra selladora posee unos topes de seguridad que permiten colocar el capilar y la zona de carga siempre en el lugar adecuado y dispone de un indicador luminoso para avisar del tiempo del sellado correcto. Una vez introducidas las muestras en el capilar y colocadas entre las dos marcas de seguridad, se introducía verticalmente la punta del capilar por la punta amarilla de la selladora hasta que el extremo del capilar llega al tope de seguridad, a continuación, accionábamos moderadamente la parte superior hasta que se unía con la base del mecanismo y finalizábamos cuando se encendía el indicador luminoso. La principal ventaja de este mecanismo es que asegura la misma cantidad de calor y tiempo aplicado. (74)



Ilustración 10: Vista frontal de la selladora SafeSealer.

Fuente: Elaboración propia.

2. Mínimo volumen.

El principio de mínimo volumen de vitrificación fue propuesto por A. Arav (75), quien formuló una ecuación en la que cuanto menor fuera el volumen que contiene las muestras mayor sería la probabilidad de vitrificación, de manera que el volumen de medio crioprotector que contiene la muestra resulta de vital importancia debido a su relación directa con la probabilidad de vitrificación y por tanto la supervivencia. Como hemos comentado con anterioridad, otras de las principales ventajas de la utilización de mínimo volumen es que se puede conseguir disminuir notablemente las cantidades de crioprotector con la consiguiente disminución de toxicidad de los mismos. (29)

3. Altas tasas de enfriamiento y calentamiento.

Las tasas de enfriamiento y calentamiento están ligadas a la supervivencia de las muestras biológicas, así que para diseñar un sistema de vitrificación cerrado y eficiente es imprescindible velocidades de enfriamiento y calentamiento lo suficientemente altas como para evitar la formación de cristales de hielo intracelular. La utilización del nitrógeno líquido como solución criogénica ofrece la posibilidad de conseguir una tasa de enfriamiento extremadamente elevada así que cuanto más rápido se enfríe la muestra, los cristales en el medio intracelular serán más pequeños, sin embargo, cuanto más pequeños sean estos cristales más capacidad tendrán para aumentar de tamaño durante la fase de calentamiento, de manera que para compensar este fenómeno es necesario altas tasas de calentamiento logrando bloquear esta recristalización. (29)



2.4. Daños biológicos.

Durante la criopreservación las muestras biológicas están expuestas a sufrir diferentes tipos de daños morfológicos y funcionales. Uno de los principales daños son el hielo intracelular y la excesiva toxicidad del crioprotector. La velocidad de enfriamiento será la variable que determine el tipo de daño, de manera que, si usamos por ejemplo el método de criopreservación de congelación lenta, la principal causa del daño es el hielo intracelular debido al proceso de ósmosis y descenso del punto crioscópico. Sin embargo, si usamos el método de vitrificación, la principal causa del daño es la toxicidad ocasionada por la presencia de elevadas concentraciones de crioprotector. Otro tipo de daño es el aumento de la presión osmótica originado por la introducción de crioprotector en la célula. En el proceso de descongelación durante la extracción del crioprotector de las células, el agua entra más rápido de lo que sale el crioprotector, así que para prevenir dicho suceso se emplea una solución decreciente con sacarosa, junto con soluciones decrecientes de crioprotector. (8)

Asimismo, las células pueden sufrir también fractura plana, es decir, disección física de los embriones, ocasionada por un cambio no uniforme en el volumen de la solución producido por un rápido cambio de fase. Por último, si durante la descongelación existe una parte localizada que posee una temperatura muy inferior al resto, las muestras pueden sufrir daños físicos como el hielo extracelular (8).

2.5. Aplicaciones.

La criopreservación es una de las técnicas con más proyección en el futuro para el mantenimiento de material biológico a bajas temperaturas y a largo plazo. Actualmente la criopreservación puede emplearse en una amplia gama de sectores tanto a nivel científico, industrial como experimental, por ejemplo, en la acuicultura, agricultura, ciencias biológicas y biotecnológicas etc. Gracias a esta técnica se podrá permitir el desarrollo del sector de la alimentación y garantizar una nutrición adecuada para la población humana, se podrán obtener individuos de determinadas especies en cualquier época del año solucionando el problema de la escasez de productos de aquellas especies que tienen un ciclo reproductor estacional, se podrán seleccionar individuos que soporten mejor las condiciones de cultivo intensivo e incluso desde el punto de vista ecológico se podrá evitar la extinción de especies amenazadas. Sin embargo, es en el punto de vista clínico donde la criopreservación ha supuesto un impacto tremendo haciendo una gran contribución a los tratamientos de fertilidad, como por ejemplo reducir la tasa de gestación múltiple a través de la transferencia de



un único embrión, obtener mayor aprovechamiento de un solo ciclo de estimulación ovárica, permitir la maternidad a personas por diferentes razones médicas etc. (6). En nuestro proyecto hemos detallado el desarrollo de una técnica, descrita en capítulos posteriores, para poder aplicarla a este sector clínico.

En la siguiente ilustración podemos apreciar los resultados de supervivencia de las diferentes publicaciones acerca de los resultados con embriones y blastocitos vitrificados (29).

AUTOR	ESTADIO DE DESARROLLO	TASA DE SUPERVIVENCIA	TASA DE EMBARAZO	Observaciones
Liu et al. 2013 (71)	Embrión D+3	97.6%	36.3%	
Panagiotidis et al. 2013 (72)	Blastocisto	84.1%	45.9%	Abierto
		82.1%	42.4%	Cerrado
Chen et al. 2013(73)	Blastocisto	98%	47.6%	Abierto
		95.8%	42.2%	Cerrado
Hashimoto et al. 2013(74)	Blastocisto	96.9%	46.8%	Abierto
		97%	45.4%	Cerrado
Kang et al. 2013(75)	Blastocisto	96.6%	41.8%	Transferencia única
		97.8%	48.1%	Transferencia doble
Van Landuyt et al. 2013(76)	Embrión D+3	94%	-	20.7% Tasa de implantación
Muthukumar et al. 2013(77)	Blastocisto	85.5%	52.6%	Día 5
		79.6%	32.6%	Día 6
Roy et al. 2014(78)	Blastocisto	94.4%	58.8%	
Murakami et al. 2014(79)	Blastocisto	98.7%	51.5%	
		98.9%	56.0%	
Levron et al. 2014(80)	Embrión D+2, D+3	81.6%	20.0%	
Reed et al. 2015(81)	Blastocisto	96.3%	46.2%	No biopsiados
		97.6%	58.2%	Biopsiados
Total		96.3%	45.9%	

Ilustración 11: Estudios publicados de vitrificación de embriones y blastocitos en diferentes estados de desarrollo.

Fuente: (29).

2.6. Información adicional sobre el instrumento de medida para el experimento, el ratón.

El ratón es el modelo biológico más usado en investigaciones científicas debido a las numerosas ventajas que ofrecen. Una de las líneas de investigación es la reproducción asistida en la cual se centrará nuestro proyecto. Algunas ventajas que presenta el ratón son (76):

- De fácil cuidado y mantenimiento debido a su pequeño tamaño.
- Bajos costos de manutención.



- Eficiencia reproductiva
- Tienen un sistema inmune y genoma similar al de los seres humanos.
- Breve período de gestación.

Es importante destacar que para obtener unos resultados satisfactorios en los experimentos es primordial cumplir previamente con unas condiciones óptimas de cuidado del animal. Como podemos observar en la ilustración estas condiciones están relacionadas con el ambiente que lo rodea (76).



Ilustración 12: Condiciones para la manipulación.

Fuente: (76).

En cuanto al desarrollo embrionario del ratón podemos decir que es completamente diferente al de otras especies ya que una de las principales características de los embriones de ratón es que no se asientan sobre la yema como ocurre en embriones de otras especies, tales como peces o anfibios (77).

Tras la fecundación del óvulo por parte del espermatozoide, el ovocito fertilizado experimenta una serie de divisiones mitóticas que ocasionan un incremento del número de células dividiéndose sucesivamente en dos, cuatro, ocho, dieciséis y treinta y dos células, en cambio, este incremento de células no va a producir un aumento del tamaño neto. El día posterior a la punción, y si se ha producido efectivamente la fecundación, el embrión recibe el nombre de cigoto y estará formado por dos corpúsculos polares (2CP) y dos pronúcleos (PN). El segundo día el embrión ya



ha realizado las primeras divisiones y tiene entre 2-4 células, también conocidas como blastómeras y en el tercer día el embrión tiene entre 6-8 células. Tres días después de la fecundación, las células del embrión se dividen hasta formar la mórula formada por un total de dieciséis células, momento en el cual se produce una distinción entre células externas e internas. Las células internas de la mórula constituyen la masa celular interna que formará el embrión y las células externas constituyen el trofoectodermo que ayudará a formar la placenta. Estas células externas inician un transporte activo por la zona pelúcida que recubre el embrión hasta la masa celular interna que permiten la entrada de líquido para formar una cavidad interna denominada blastocele, lo que se conoce como proceso de cavitación. La blastocele es una cavidad interior rellena de líquido e identifica al estadio de blastocisto. (77)

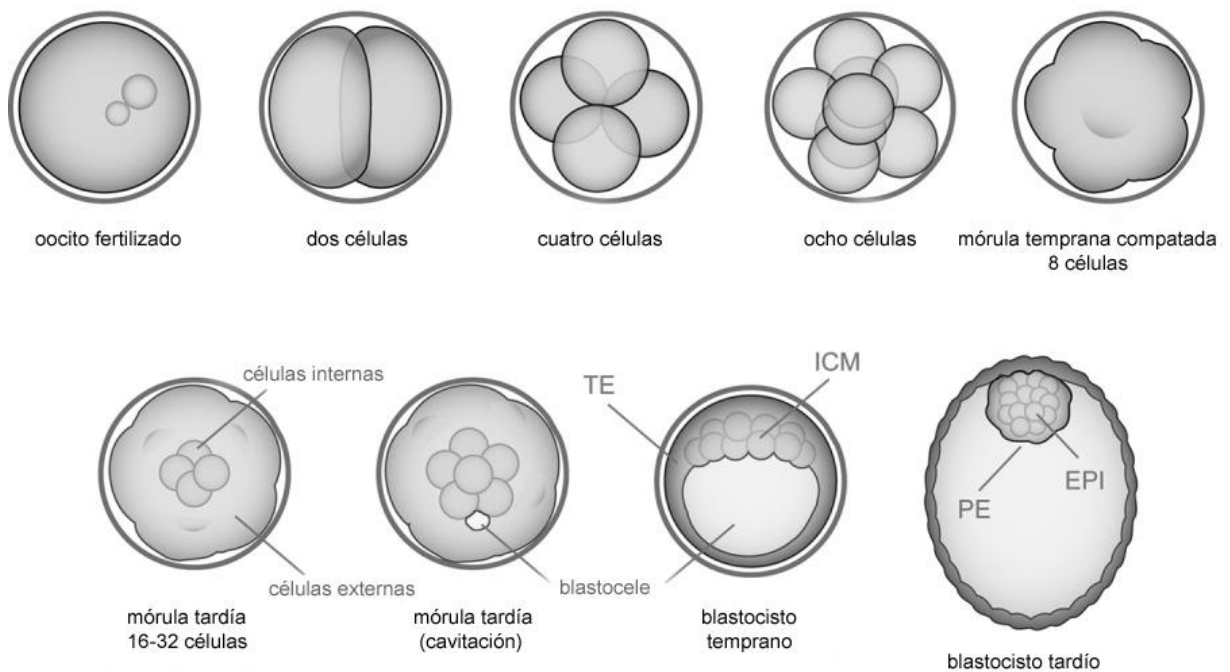


Ilustración 13: Desarrollo embrionario en el ratón.

Fuente: (77).

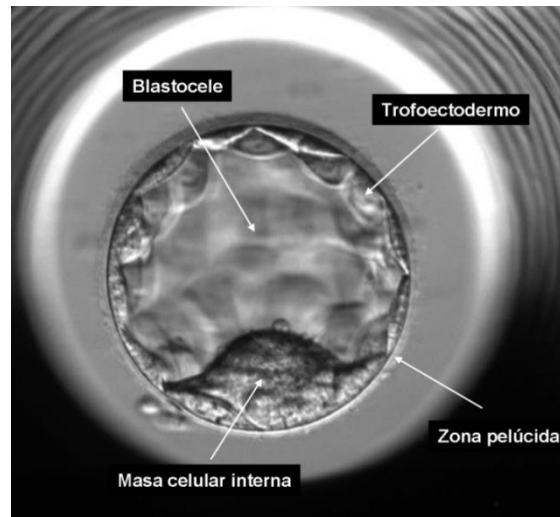


Ilustración 14: Visión de una mórula.

Fuente: Google imágenes.

Por último, vamos a justificar qué estadio es el más idóneo para la vitrificación y posterior transferencia embrionaria. El proceso de criopreservación se puede aplicar tanto a embriones en estadios tempranos de desarrollo como en estadio de blastocisto donde la calidad de éstos es la variable que influye decisivamente en la supervivencia (78). La congelación de embriones de peor calidad lleva a bajas tasas de supervivencia y de implantación embrionaria (79), de manera que cuanto más sano o mejor sea un embrión (más calidad), más probabilidad tendrá de sobrevivir a la descongelación embrionaria (80). Por otra parte, se ha demostrado que en el embrión en fase de blastocisto tiene mayor capacidad de implantación que los embriones en estadios tempranos de desarrollo ya que a la fase de blastocisto solo llegan los embriones de buena calidad así que la utilización de embriones en estadio de blastocisto es el más idóneo porque disminuye la posibilidad de gestación múltiple conservando la tasa de éxito de la transferencia, y supone una selección natural de los embriones con mayor potencial de desarrollo (80).

En nuestros experimentos hemos aplicado nuestro método a las muestras en el estado de desarrollo correspondiente al día 2 y al día 4 debido a su mayor resistencia a la manipulación.





3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

La finalidad de este trabajo de investigación es estudiar el rendimiento de un dispositivo cerrado de dimensiones reducidas, SafeSpeed, para examinar la viabilidad de obtener una alta supervivencia posterior a la vitrificación de los embriones procedentes del ratón.

3.2. Objetivos específicos.

Como objetivos específicos, se plantean los siguientes:

- Evaluación del desarrollo morfológico de las muestras biológicas del grupo control.
- Evaluación del desarrollo morfológico de las muestras biológicas criopreservadas.
- Inspección de la supervivencia morfológica de las muestras biológicas del grupo control.
- Inspección de la supervivencia morfológica de las muestras biológicas criopreservadas.
- Estudiar los resultados obtenidos hallando la tasa de supervivencia de ambos grupos.



4. Material y métodos.

4.1. Localización.

El ensayo se desarrolló en dos localizaciones diferentes, en cada una de ellas se realizó la producción de embriones y aplicación del método de criopreservación.

El proceso de producción de embriones se realizó en el Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla en el término municipal de Espartinas (Sevilla) con coordenadas 37°22'42.5"N 6°07'42.0"W.



Ilustración 15. Centro de producción y experimentación animal.

Fuente: Google Maps (2019).

El ensayo experimental se llevó a cabo en nuestro laboratorio de criopreservación.

4.2. Material animal.

Para el desarrollo de los ensayos se utilizaron ratones como fuente de embriones, procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Dicho centro trabaja con ratones de distintas especies, una de ellas era la cepa FVB y la otra cepa era la CD-1, el centro produce en cantidades suficientes ratones hembras FVB y en menor cantidad hembras CD-1, de tal modo que,



con el fin de adaptarnos a sus necesidades acordamos la fabricación de embriones únicamente con hembras FVB, no obstante, para los ratones machos usábamos las dos cepas. De este modo, para la generación de embriones de ratón se realizaron dos cruces diferentes, un cruce era FVB*FVB, es decir hembra de la cepa FVB y macho de la cepa FVB, de este cruce se obtenían embriones no híbridos, ya que eran procreados por individuos de la misma especie; el otro cruce era FVB*CD-1, es decir, hembra de la cepa FVB y macho de la cepa CD-1, de dicho cruce se obtenían embriones híbridos, comúnmente conocido como mestizos, ya que eran procreados por individuos de distinta especie.

La razón por la cual se utilizaron también ratones machos CD-1 en el cruce fue porque a la hora de realizar el proceso de criopreservación observamos que los embriones generados tenían más capacidad de supervivencia y más fortaleza que los que procedían del cruce con macho FVB.

Atendiendo a la programación de producción de muestras por el personal en el Centro de Producción y Experimentación Animal pactamos 20 o 30 embriones los lunes. Igualmente, la cantidad de embriones generados nunca era 100% fijo semanalmente, ya que dependían del número de ratones hembras disponibles en el centro para microinyectar.



Ilustración 16: Ratón de laboratorio.

Fuente: Google imágenes.

4.3. Manejo animal.

Los embriones llegaban a nuestro laboratorio de criopreservación en transporte a una temperatura de 34°C-35°C, para conservarlos directamente a 37°C de temperatura y 6% de concentración de CO₂, para ello se contó con un termo de acero inoxidable relleno de lentejas.



A la entrada en el laboratorio las muestras se observaban para verificar si efectivamente estaban formadas por dos corpúsculos polares y dos pronúcleos, es decir, se había producido la fecundación. Seguidamente dichas muestras se depositaban en microgotas (G-IVF, G1Plus, G2Plus, Vitrolife) cubierta de aceite mineral en una placa de Petri y posteriormente se alojaban en la incubadora del laboratorio y se dejaban en cultivo hasta el segundo día de desarrollo cuando se seleccionaban para ser criopreservadas.

El aceite mineral fue el medio que se utilizó como protector de las microgotas de cultivo embrionario, dicho medio simulaba al máximo el ambiente uterino ya que aportaba todos los nutrientes necesarios para facilitar el crecimiento celular, gracias a este medio se conseguía proteger los embriones frente a posibles contaminaciones, cambios de pH y temperatura.

Las placas donde se encontraban las microgotas cubiertas de aceite mineral recibían el nombre de placas de cultivo, esta placa se dividió en tres zonas, las cuales fueron identificadas por líneas horizontales trazadas con un bolígrafo indeleble. La parte superior se usaba para depositar las muestras biológicas que llegaban en los viales, la parte central se utilizaba para depositar los embriones que se criopreservaban en el día 2 y la parte inferior se utilizaba para alojar los embriones que se criopreservaban en el día 4. Por lo tanto, la zona superior se dedicaba para el grupo control y la zona central e inferior para el grupo vitrificado, además, en cada una de las zonas había un total de 10 microgotas y en cada microgotas se podía depositar un máximo de 4 embriones para facilitar el trabajo.

Para entender mejor la disposición de las placas se muestra su distribución en la siguiente ilustración:

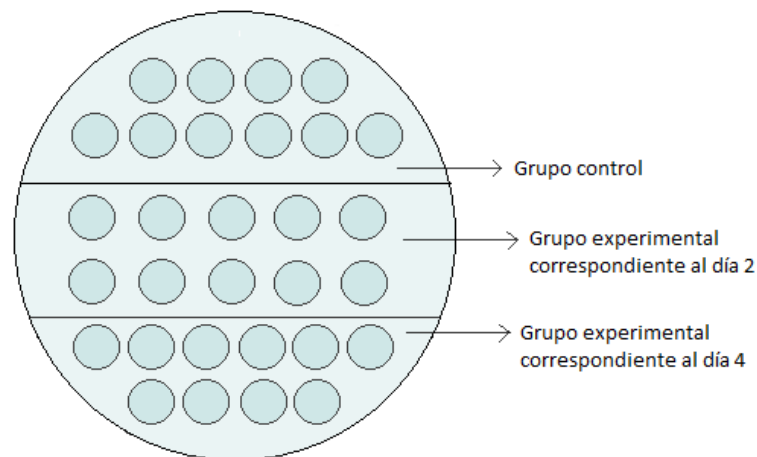


Ilustración 17: Distribución de las muestras biológicas en la placa.

Fuente: Elaboración propia.



El resto de medidas previas que se tomaron fueron las siguientes:

- Envío de termos relleno de lentejas cada dos semanas, esta tarea fue realizada por mí haciendo uso del servicio de envío que facilita la secretaría de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Dichos termos eran enviados hasta el Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla y recogidos por Dña. Ana Morilla Camacho.
- Confección de un calendario semanal con Dña. Ana Morilla Camacho para establecer los días de envío de las muestras biológicas.
- Introducción del termo en la incubadora del centro noche previa a la extracción de embriones.
- Proceso de generación de muestras biológicas y posterior introducción de los embriones en viales dentro del termo realizado por Dña. Ana Morilla Camacho.
- Calibración de la incubadora del laboratorio semanalmente.
- Control de las condiciones higiénicas del sistema de agua, que consistieron en el cambio de agua diariamente.
- Control de las condiciones higiénicas de la incubadora, que consistieron en el cambio de agua de las bandejas diariamente, así como de una limpieza exhaustiva semanalmente con gasas estériles y agua desionizada.
- Supervisión de las condiciones higiénicas del laboratorio, dichas labores de limpieza y desinfección fueron los propios de un laboratorio de estas características, no variando la rutina establecida para que no influyera en los resultados.
- Colaboración con la empresa biotecnológica SafePreservation que fabrica y comercializa tanto los dispositivos como medios SafeSpeed, siendo dicha empresa la encargada de la producción y envío tanto de los dispositivos como de los accesorios necesarios.
- Control de pedidos y almacenamiento de material de laboratorio, realizados por mí y supervisado por D. Ramón de Jesús Risco Delgado, almacenándose en instalaciones propias.

Una vez comenzadas las pruebas y durante su ejecución también se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- Apoyo, seguimiento y observación de la evolución en el proceso de experimentación por parte de D. Ramón Risco y contacto con él para informarle del desarrollo de las pruebas.



- Reuniones mensuales con alumnos del laboratorio del Departamento de Física Aplicada de la ETSI y con D. Ramón de Jesús Risco Delgado para proponer mejoras del experimento.
- Una vez acabado el experimento los embriones se retiraban del laboratorio y se introducían en los depósitos que el laboratorio tenía a tal efecto.

4.4. Diseño experimental.

El experimento consistió en la realización de dos protocolos: producción de muestras biológicas y criopreservación, los cuales fueron ejecutados en localizaciones diferentes.

4.4.1. Protocolo de producción de embriones.

Este protocolo se basaba en hormonar a ratones hembras con el fin de aumentar el número de embriones que eran capaces de generar, para ello se emplearon dos hormonas: PMSG (pregnat mare serum gonadotrophin) y HCG (human chorionic gonadotrophin) las cuales inducían a las ratonas al celo y a la súper ovulación. Para la obtención de embriones se utilizaron hembras de entre 4-8 semanas de edad de la cepa FVB.

El protocolo era el siguiente:

- Día 1: inyección intraperitoneal de la hormona PMSG.
- Día 3: transcurridas 48 horas de la primera inyección, inyección intraperitoneal de la hormona HCG, posteriormente, se introducía a la hembra con el macho para la cópula produciéndose la fecundación por la noche.
- Día 4: comprobación de la existencia de tapón mucoso vaginal en las hembras, aquellas que sí lo presentaban eran las que habían copulado con el macho y eran sacrificadas por dislocación vertical para extraer los embriones del útero en una célula.

Este protocolo fue realizado en el Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla por Dña. Ana Morilla Camacho.

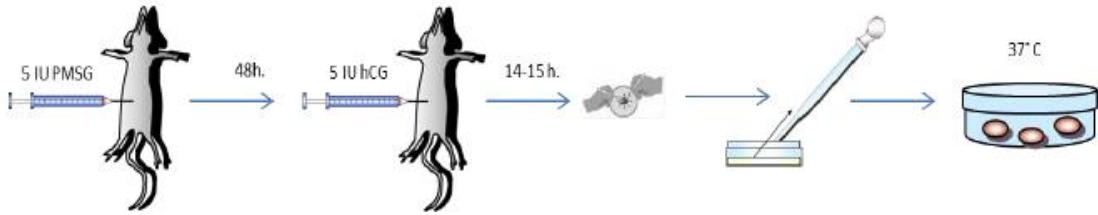


Ilustración 18: Estimulación ovárica y obtención de embriones.

Fuente: (29).



Ilustración 19: Sujeción de la ratona con mano izquierda.

Fuente: Google imágenes.

4.4.2. Protocolo de criopreservación.

El protocolo de criopreservación se lleva a cabo mediante la realización de dos procedimientos: vitrificación y recalentamiento.

Antes de proceder a la realización del método de criopreservación se efectuaron las siguientes medidas:

- Encendido de la placa calefactora, el estereomicroscopio y la selladora.
- Puesta en marcha del sistema de calentamiento del agua 15 minutos previos a la realización del experimento y comprobación con el termómetro que el agua está a la temperatura de 37 °C.
- Elaboración del sistema de aspiración.



- Colocación a mano de todo el material requerido durante la elaboración de las pruebas, tales como pipetas Pasteur, puntas amarillas, tijeras etc.
- Todas las soluciones de vitrificación fueron expuestas al menos durante una hora al laboratorio e introducidas en la vinoteca a 4-6°C de temperatura.
- Las soluciones de recalentamiento DS y WS fueron expuestas a temperatura ambiente del laboratorio por al menos una hora, y el medio TS se colocó en la incubadora a 37°C.
- Introducción del nitrógeno líquido en una caja de espuma de poliestireno con 20 cm de profundidad aproximadamente para permitir un hundimiento profundo sin riesgos de golpear su fondo con el dispositivo SafeSpeed.
- Introducción del agua esterilizada a 37 °C en un recipiente de plástico con una tapa deslizante para mantener la temperatura.
- Colocación de la caja de nitrógeno y del recipiente de agua de tal manera que estén separadas aproximadamente 2 cm y ambos bordes tengan la misma altura.
- Esterilización de pipetas Pasteur eliminando así cualquier posible microorganismo. La esterilización se hacía por calor seco usando la técnica de flameado.
- Asegurarse de que no haya anomalías ni restos de sellados anteriores en la selladora.
- Preparación de las placas de Petri, dichas placas fueron identificadas con un rotulador indeleble por la parte superior para así evitar posibles confusiones. Las placas preparadas fueron las siguientes:
 1. Placa ES.
 2. Placa VS.
 3. Placa TS.
 4. Placa DS.
 5. Placa WS.
- Las placas ES y VS se mantenían sobre la pletina térmica a 37°C evitando en todo momento la sobreexposición de los embriones a la luz y las placas TS, DS y WS se conservaban a temperatura ambiente.



4.4.2.1. Vitrificación.

El proceso de vitrificación consiste en una ultra rápida y ultra congelación de los embriones. Este proceso siempre se realizó a temperatura ambiente, en nuestro caso 23-25±0,5°C. Para realizar dicho proceso contábamos con el kit de medios de vitrificación SafeSpeed. Este kit consta de 2 soluciones:

- ES (Equilibration Solution). Contiene 7,5 % de etilenglicol y 7,5 % de dimetilsulfóxido.
- VS (Vitrification Solution). Contiene 15 % de etilenglicol y 15 % de dimetilsulfóxido.

El procedimiento de vitrificación se realizó en 4 fases: Equilibrado, Paso por la solución de vitrificación VS, Carga y Vitrificación.

I. Equilibrado:

- Creación de una gota de 100 µl de la solución ES en la placa ES usando la micropipeta.
- Traslado de los embriones de la placa de cultivo a la gota de la solución ES usando el sistema de aspiración.
- Incubación de los embriones durante 10 minutos en la gota.
- Transcurridos 9 minutos de la fase I creación de una gota de 100 µl de la solución VS en la placa VS usando la micropipeta.

II. Paso por la solución de vitrificación VS:

- Una vez que se completa el equilibrio, es decir, cumplidos los 10 minutos, traslado de los embriones de la gota de la solución ES de la placa ES a la gota de la solución VS de la placa VS usando el sistema de aspiración.
- En esta solución se lavaron los embriones por pipeteo al menos tres veces para eliminar cualquier ES sobrante.
- Incubación de los embriones durante 1 minuto en la gota de la solución VS.

III. Carga:

- Transcurrido el minuto de la fase II los embriones se cargaron por aspiración dentro del capilar del dispositivo SafeSpeed y se colocaban entre las dos marcas de seguridad negras.
- Seguidamente se selló el capilar por uno de sus extremos usando la selladora SafeSealer.



IV. Vitrificación:

- Deslizar la capa protectora exterior de la pajueta para así proteger el capilar.
- Introducir la pajueta verticalmente en el recipiente con nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y permanecer durante 6 segundos.

4.4.2.2. Recalentamiento.

El método de criopreservación se concluye con el proceso de recalentamiento, conocido también como desvitrificación. Este proceso consiste en una ultra rápida y ultra segura descongelación de embriones vitrificados, es decir, trata de aumentar la transferencia de calor.

Al igual que el proceso de vitrificación, el proceso de recalentamiento siempre se realizó a temperatura ambiente, para realizar dicho proceso contábamos con el kit de medios de recalentamiento SafeSpeed. Este kit consta de 3 soluciones:

- TS (Thawing Solution). Contiene 1 M de sacarosa.
- DS (Diluent Solution). Contiene 0.5 M de sacarosa.
- WS (Washing Solution.) Es una solución de lavado.

En este procedimiento los embriones se van pasando por varios medios con concentraciones decrecientes de crioprotectores, consiguiendo así la rehidratación celular, de forma que se van reemplazando los crioprotectores por agua. Es muy importante respetar los tiempos de este protocolo ya que de lo contrario podrían dañarse las estructuras celulares del embrión y no sobrevivir. El procedimiento de recalentamiento se realizó en 5 fases: Desvitrificación, Paso por la solución de recalentamiento TS, Paso por la solución de recalentamiento DS, Primer lavado y Segundo lavado.

I. Desvitrificación:

- El dispositivo SafeSpeed se transfirió con un movimiento recto, directo y rápido desde el recipiente de nitrógeno líquido hasta el recipiente de agua caliente y se agitaba durante unos 3 segundos aproximadamente en el agua. Este proceso de transferencia de un lugar a otro se tenía que hacer en menos de un segundo para así facilitar una alta tasa de calentamiento.
- Transcurridos los 3 segundos se extrajo la pajueta del agua y se secaba con gasas estériles.
- Creación de una gota de $100\text{ }\mu\text{l}$ de la solución TS en la placa TS usando la micropipeta.



- Recorte capilar sobre el área sellada.
- II. Paso por la solución de recalentamiento TS:
- Traslado de los embriones del capilar a la gota de la solución TS de la placa TS. En dicha solución se lavaron los embriones por pipeteo hasta eliminar cualquier VS sobrante.
 - Permanencia de los embriones durante 1 minuto en la gota.
 - Antes que finalizara el minuto de la fase II, creación de una gota de 100 µl de la solución DS en la placa DS usando la micropipeta.
- III. Paso por la solución de recalentamiento DS:
- Cumplido el minuto de la fase II traslado de los embriones de la gota de la solución TS a la gota de la solución DS en la placa DS usando el sistema de aspiración. Se lavaron los embriones como en las otras soluciones para eliminar cualquier TS sobrante.
 - Incubación de los embriones durante 3 minutos en la gota.
 - Transcurridos los 2 minutos de la fase III, creación de una gota de 100 µl de la solución WS en la placa WS usando la micropipeta.
- IV. Primer lavado:
- Cumplidos los 3 minutos de la fase III, traslado de los embriones de la gota de la solución TS a la gota de la solución WS de la placa WS.
 - Permanencia de los embriones durante 5 minutos en la gota de la solución WS.
 - Transcurridos los 4 minutos de la fase IV, creación de otra gota de 100 µl de la solución WS en la placa WS usando la micropipeta.
- V. Segundo lavado:
- Transcurridos los 5 minutos de la fase IV, traslado de los embriones de la primera gota de la solución WS a la segunda gota de la solución WS usando el sistema de aspiración.
 - Incubación de los embriones durante 1 minuto en la gota.
 - Traslado de los embriones de la segunda gota de la solución WS a la placa de cultivo.
 - Introducción de la placa de cultivo a la incubadora.



4.5. Material instrumental.

Las herramientas utilizadas durante la realización del ensayo fueron las siguientes:

- Incubadora, para mantener las muestras biológicas a 37 °C de temperatura y una concentración del 6 % de CO₂.



Ilustración 20: Incubadora DH DURAFLow AUTOMATIC.

Fuente: Elaboración propia.

- Bomba de oxígeno, conectada a la incubadora para proporcionarle 6 % de CO₂.



Ilustración 21: Bomba de oxígeno.

Fuente: Elaboración propia.



- Dispositivo calibración de CO_2 (Labotect/InControl 1050), para control y evaluación de CO_2 , temperatura y oxígeno.



Ilustración 22. Dispositivo de medición independiente (Labotect/ InControl 1050).

Fuente: (81).

- Dispositivo SafeSpeed, soporte para vitrificar y recalentar las muestras biológicas.

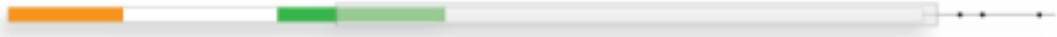


Ilustración 23. Dispositivo SafeSpeed.

Fuente: Google imágenes.

- Gasas estériles, para limpiar la incubadora y secar el dispositivo SafeSpeed.



Ilustración 24. Gasas estériles.

Fuente: Google imágenes.

- Agua desionizada, para desinfectar la incubadora.



Ilustración 25. Agua desionizada.

Fuente: Google imágenes.

- Sistema de agua, compuesta por una nevera y un termostato que calienta el agua hasta alcanzar la temperatura deseada de 37°C.



Ilustración 26. Sistema de agua.

Fuente: Elaboración propia.

- Termómetro, para verificar que el agua está a la temperatura deseada.



Ilustración 27. Termómetro.

Fuente: Elaboración propia.



- Nitrógeno líquido, para congelar las muestras biológicas.



Ilustración 28: Nitrógeno líquido.

Fuente: Google imágenes.

- Temporizador, para controlar los tiempos marcados durante el experimento.



Ilustración 29. Temporizador.

Fuente: Google imágenes.



- Termo de acero inoxidable para transportar, relleno de lentejas, los viales con las muestras biológicas desde el Centro de producción y experimentación animal de la Universidad de Sevilla hasta el laboratorio de manipulación.



Ilustración 30: Termo de acero inoxidable.

Fuente: Google imágenes.

- Lentejas, para mantener la temperatura de las muestras en el interior del termo. Con ellas se lograba que los embriones conservaran la temperatura en el trayecto desde el Centro de Producción y Experimentación Animal hasta el laboratorio.
- Soluciones SafeSpeed, para la criopreservación de las muestras.



Ilustración 31. Medios SafeSpeed.

Fuente: Elaboración propia.



- Vinoteca, para mantener los medios entre 6°C-8°C de temperatura.



Ilustración 32. Vinoteca.

Fuente: Elaboración propia.

- Placa de Petri, para situar en ella las gotas de las soluciones y las muestras biológicas tanto para el grupo de control como para el grupo vitrificado.

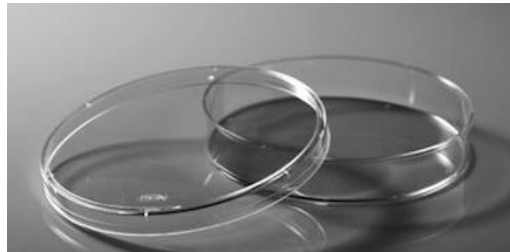


Ilustración 33. Placa de Petri FALCON de 35 mm.

Fuente: Google imágenes.

- Sistema de aspiración, para transportar las muestras por las diferentes gotas de las soluciones, así como para cargarlos dentro del capilar para proceder a vitrificarlos y recalentarlos. El método de uso consiste en absorber muy suavemente por la boquilla para atrapar las muestras. Se conoce comúnmente como pipeta de boca y consta de un conector, dos tubos de silicona y dos filtros estándar de 22 micras, en cada extremo del conector se acopla los filtros y a éstos filtros se conectan los tubos de silicona.
En función del uso del sistema de aspiración su construcción es diferente, si el sistema se usa para trasladar muestras por las distintas soluciones hay que conectar por un extremo del tubo una punta amarilla y por el otro extremo pipetas Pasteur esterilizadas; en cambio, si el sistema se usa para cargar



muestras, hay que conectar por un extremo una punta amarilla y por el otro extremo el dispositivo SafeSpeed. En ambos casos la punta amarilla se introducía en la boca y tanto la pipeta Pasteur esterilizada como el dispositivo SafeSpeed se sujetaba con la mano derecha.



Ilustración 34. Sistema de aspiración.

Fuente: Elaboración propia.

- Selladora SafeSealer, para sellar el capilar por uno de sus extremos evitando así la contaminación procedente del nitrógeno.



Ilustración 35. Selladora manual.

Fuente: Elaboración propia.

- Tijeras de acero inoxidable, para recortar el sellado del dispositivo SafeSpeed.



Ilustración 36: Tijeras de acero inoxidable.

Fuente: Google imágenes.



- Pletina calefactora, para seguir conservando a 37°C de temperatura las placas de Petri, evitando de este modo que se produjese choque térmico.



Ilustración 37. Pletina calefactora SBS OSAKA II PK 312.

Fuente: Elaboración propia.

- Estereomicroscopio, para buscar las muestras en las gotas de las soluciones situadas en las respectivas placas y para observar su trayectoria durante el proceso de introducción en el dispositivo SafeSpeed.



Ilustración 38. Estereomicroscopio URA Technic.

Fuente: Elaboración propia.

- Micropipeta, para extraer las gotas de las soluciones y situarlas en las placas de Petri.



Ilustración 39. Micropipeta NICHIPET EXII 0-200µl.

Fuente: Elaboración propia.



- Puntas amarillas, para colocarlas en la punta de la micropipeta con el fin de dosificar en cantidades precisas las soluciones necesarias.



Ilustración 40. Puntas amarillas GILSON 2-200 μ l.

Fuente: Google imágenes.

- Pipetas Pasteur no estériles, para desplazar las muestras por las diferentes gotas de las soluciones situadas en las placas de Petri.



Ilustración 41. Pipetas Pasteur no estériles.

Fuente: Google imágenes.





5. Resultados.

Las muestras biológicas procedentes de la superovulación de ratones fueron distribuidas en 2 grupos experimentales:

- Grupo I: grupo control o fresco que se corresponde a las muestras que no fueron criopreservadas y se dejaban en cultivo embrionario para observar su desarrollo morfológico.
- Grupo II: grupo experimental que se corresponde a las muestras que fueron criopreservadas.

Los embriones del grupo II se sometieron al procedimiento de vitrificación como se describe en el apartado 4.4.2.1 y al procedimiento de recalentamiento como se detalla en el apartado 4.4.2.2. Ambos procedimientos se llevaron a cabo cargando como máximo 4 embriones por dispositivo SafeSpeed. Dos horas después del proceso de descongelación se evaluaba la supervivencia morfológica bajo microscopio analizando las siguientes características:

- Integridad de la zona pelúcida: fracturas de la zona pelúcida, o ausencia total de la misma.
- Integridad de la membrana plasmática: a través de la existencia o no de espacio perivitelino.
- Signos de degeneración citoplasmática: deformación y/o cambio de tonalidad del citoplasma.

El calendario semanal de muestras biológicas que programábamos, como hemos comentado en apartados anteriores, dependía de la disponibilidad del Centro de Producción y Experimentación Animal, si bien generalmente se gestionaba tener las muestras el lunes. Atendiendo a dicho día, el calendario era el siguiente:

- Lunes: recepción de muestras.
- Martes: observación del desarrollo morfológico y realización del experimento.
- Miércoles: observación del desarrollo morfológico.
- Jueves: observación del desarrollo morfológico y realización del experimento.
- Viernes: observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.



Los resultados obtenidos en este trabajo, se van a mostrar en unas tablas realizadas por cada uno de los ensayos cometidos semanalmente, para así entender mejor su comparación. La distribución de dichas tablas fue la siguiente:

- Las columnas se rellenaban con el día de realización del trabajo, además de especificar si ese día se llevaba a cabo el proceso de vitrificado y si sobrevivía la muestra o no.
- Las filas se rellenaban con números para identificar cada una de las muestras.



Tabla 1. Resultados semana 1. Recepción de 30 muestras FVB*FVB.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	16/01/2017	17/01/2017	17/01/2017	17/01/2017	18/01/2107	19/01/2017			20/01/2017
	Téc	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam			Miriam
CONTROL	1	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	2	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	3	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula	-	-	No visto
	4	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	5	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula	-	-	No visto
	6	2CP	2 Cél	-	-	4 Cél	Blasto	-	-	No visto
	7	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	8	2CP	2 Cél	-	-	4 Cél	Mórula cavitando	-	-	No visto
	9	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	10	2CP	2 Cél	-	-	4 Cél	Mórula	-	-	No visto
	11	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	12	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compacta	Mórula compacta	-	-	No visto
	13	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	14	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	No visto
	15	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	No visto
PROTOCOLO	16	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	17	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	18	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	19	2CP	2 Cél	Sí	Sí	4 Cél	Mórula	-	-	No visto
	20	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Mórula	-	-	No visto
	21	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	22	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	23	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	24	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	25	2CP	2 Cél	Sí	Sí	4 Cél	Mórula	-	-	No visto
	26	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	No visto
	27	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	No visto
	28	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	No visto
	29	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	No visto
	30	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	No visto



Tabla 2. Resultados semana 2. Recepción de 29 muestras FVB*FVB.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	23/01/2017	24/01/2017	24/01/2017	24/01/2017	25/01/2017	26/01/2017			27/01/2017
	Téc	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam			Miriam
CONTROL	1	2CP	2 Cél	-	-	5 Cél	Mórula	-	-	No visto
	2	2CP	2 Cél	-	-	4 Cél	Mórula compacta	-	-	No visto
	3	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	4	2CP	2 Cél	-	-	3 Cél	Mórula	-	-	No visto
	5	2CP	2 Cél	-	-	4 Cél	Mórula	-	-	No visto
	6	2CP	2 Cél	-	-	4 Cél	Mórula	-	-	No visto
	7	2CP	2 Cél	-	-	4 Cél	Mórula compacta	-	-	No visto
	8	2CP	2 Cél	-	-	3 Cél	Mórula	-	-	No visto
	9	2CP	2 Cél	-	-	4 Cél	Mórula	-	-	No visto
	10	2CP	2 Cél	-	-	2 Cél	Mórula	-	-	No visto
	11	2CP	2 Cél	-	-	5 Cél	Mórula	-	-	No visto
	12	2CP	2 Cél	-	-	7 Cél	Mórula	-	-	No visto
	13	2CP	2 Cél	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	No visto
	14	2CP	2 Cél	-	-	3 Cél	Mórula	-	-	No visto
	15	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	No visto
PROTOCOLO	16	2CP	2 Cél	Sí	Sí	4 Cél	Mórula	-	-	No visto
	17	2CP	2 Cél	Sí	Sí	4 Cél	Mórula	-	-	No visto
	18	2CP	2 Cél	Sí	Sí	7 Cél	Mórula	-	-	No visto
	19	2CP	2 Cél	Sí	Sí	7 Cél	Mórula	-	-	No visto
	20	2CP	2 Cél	Sí	Sí	5 Cél	Mórula	-	-	No visto
	21	2CP	2 Cél	Sí	Sí	8 Cél	Mórula	-	-	No visto
	22	2CP	2 Cél	Sí	Sí	4 Cél	Mórula	-	-	No visto
	23	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Blasto	-	-	No visto
	24	2CP	2 Cél	Sí	Sí	5 Cél	Mórula	-	-	No visto
	25	2CP	2 Cél	Sí	Sí	7 Cél	Mórula	-	-	No visto
	26	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	No visto
	27	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	No visto
	28	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	No visto
	29	2CP	2 Cél	No	-	-	-	-	-	No visto



Tabla 3. Resultados semana 3. Recepción de 20 muestras FVB*FVB.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	30/01/2017	31/01/2017	31/01/2017	31/01/2017	01/02/2017	02/02/2017			03/02/2017
	Téc	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam			Miriam
CONTROL	1	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	2	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	3	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto en formación
	4	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	5	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	6	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	7	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto en formación
	8	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Blasto	-	-	Blasto
	9	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	10	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
PROTOCOLO	11	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	12	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	13	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	14	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	15	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto en formación
	16	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	17	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	-
	18	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	-
	19	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	-
	20	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	-



Tabla 4. Resultados semana 4. Recepción de 20 muestras FVB*FVB.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	06/02/2017	07/02/2017	07/02/2017	07/02/2017	08/02/2017	09/02/2017			10/02/2017
	Téc	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam			Miriam
CONTROL	1	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto
	2	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto
	3	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto
	4	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto
	5	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto
	6	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto
	7	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto
	8	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto en formación
	9	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto en formación
	10	2CP	2 Cél	-	-	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto en formación
PROTOCOLO	11	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Mórula compactada	-	-	Blasto en formación
	12	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Mórula compactada	-	-	Mórula con cavidad iniciándose
	13	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Mórula compactada	-	-	Mórula con cavidad iniciándose
	14	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Mórula compactada	-	-	Mórula con cavidad iniciándose
	15	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Mórula compactada	-	-	Mórula con cavidad iniciándose
	16	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Mórula compactada	-	-	Mórula con cavidad iniciándose
	17	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula	Mórula compactada	-	-	Mórula compactada
	18	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	-
	19	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	-
	20	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	-



Tabla 5. Resultados semana 5. Recepción de 30 muestras FVB*CD-1.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	13/02/2017	14/02/2017	14/02/2017	14/02/2017	15/02/2017	16/02/2017			17/02/2017
	Téc	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam			Miriam
CONTROL	1	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compactada	Blasto en formación	-	-	Blasto eclosionado
	2	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compactada	Blasto en formación	-	-	Blasto eclosionado
	3	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compactada	Blasto en formación	-	-	Blasto expandido
	4	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compactada	Blasto en formación	-	-	Blasto expandido
	5	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compactada	Mórula con cavidad	-	-	Blasto expandido
	6	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compactada	Mórula con cavidad	-	-	Blasto expandido
	7	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compactada	Mórula con cavidad	-	-	Blasto expandido
	8	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	9	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	10	2CP	2 Cél	-	-	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	11	2CP	2 Cél	-	-	Mórula 3-4 Cél	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	12	2CP	2 Cél	-	-	Mórula 3-4 Cél	Mórula compactada	-	-	Blasto
	13	2CP	2 Cél	-	-	Mórula 3-4 Cél	Mórula degradada	-	-	Blasto
	14	2CP	2 Cél	-	-	Mórula degradada	Degenerado	-	-	Degenerado
	15	2CP	1 Cél	-	-	1 Cél	1 Cél	-	-	1 Cél
PROTOCOLO	16	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	17	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	18	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	19	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	20	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	21	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	22	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto expandido
	23	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto
	24	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Blasto
	25	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Mórula con cavidad
	26	2CP	2 Cél	Sí	Sí	Mórula compactada	Mórula compactada	-	-	Mórula con cavidad
	27	2CP	2 Cél	Sí	No	-	-	-	-	-
	28	2CP	2 Cél	No	-	-	-	-	-	-
	29	2CP	2 Cél	No	-	-	-	-	-	-
	30	2CP	2 Cél	No	-	-	-	-	-	-



Tabla 6. Resultados semana 6. Recepción de 20 muestras FVB*FVB.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	20/03/2017	21/03/2017	21/03/2017	21/03/2017	22/03/2017	23/03/2017			24/03/2017
	Téc	Miriam	Miriam			Miriam	Miriam			Miriam
CONTROL	1	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	2	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	3	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	4	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	5	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	6	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	7	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	8	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	9	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	10	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
PROTOCOLO	11	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	12	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	13	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	14	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	15	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	16	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	17	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	18	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	19	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	20	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado



Tabla 7. Resultados semana 7. Recepción de 30 muestras FVB*CD-1.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	27/03/2017	28/03/2017	28/03/2017	28/03/2017	29/03/2017	30/03/2017			31/03/2017
	Téc	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam			Miriam
CONTROL	1	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	2	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	3	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	4	2CP	2 Cél	-	-	No visto	4 Cél	-	-	4 Cél
	5	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	6	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	7	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	8	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	9	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Mórula
	10	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Degenerado	-	-	Degenerado
PROTOCOLO	11	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	12	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	13	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Degenerado			Degenerado
	14	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	15	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	16	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	17	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	18	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	19	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	20	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	4 Cél	-	-	Mórula
	21	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula			Blasto
	22	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	23	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	-
	24	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	-
	25	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	-
	26	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	-
	27	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	-
	28	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	-
	29	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	-
	30	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	-



Tabla 8. Resultados semana 8. Recepción de 32 muestras FVB*FVB.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	03/04/2017	04/04/2017	04/04/2017	04/04/2017	05/04/2017	06/04/2017			07/04/2017
	Téc	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam
CONTROL	1	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	2	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	3	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	4	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Blasto	-	-	No visto
	5	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	6	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	7	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	8	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	9	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	10	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
PROTOCOLO	11	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	12	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	13	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	14	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	15	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	16	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	17	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	18	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	8 Cél	Sí	No	No visto
	19	2CP	1 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	No	No visto
	20	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	No	No visto
	21	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	No	-	No visto
	22	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	No visto
	23	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	No visto
	24	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	No visto
	25	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	No visto
	26	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	No visto
	27	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	No visto
	28	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	No visto
	29	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	No visto
	30	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	No visto
	31	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	No visto
	32	2CP	2 Cél	No	-	No visto	-	-	-	No visto



Tabla 9. Resultados semana 9. Recepción de 31 muestras FVB*CD-1.

	Fecha	D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
		17/04/2017	18/04/2017	18/04/2017	18/04/2017	19/04/2017	20/04/2017	20/04/2017	20/04/2017	21/04/2017
	Téc	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam
CONTROL	1	2 CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	2	2 CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	3	2 CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	4	2 CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	5	2 CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	6	2 CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	7	2 CP	2 Cél	-	-	No visto	8 Cél	-	-	Mórula
	8	2 CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	9	2 CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
	10	2 CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	Blasto
PROTOCOLO	11	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	4 Cél	Sí	Sí	4 Cél
	12	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Mórula
	13	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Blasto
	14	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Blasto
	15	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Blasto
	16	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Blasto
	17	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Blasto
	18	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Blasto
	19	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Blasto
	20	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Blasto
	21	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Blasto
	22	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	Blasto
	23	2 CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	No	-
	24	2 CP	2 Cél	No	-	No visto	Mórula	No	-	-
	25	2 CP	2 Cél	No	-	No visto	Mórula	No	-	-
	26	2 CP	2 Cél	No	-	No visto	Mórula	No	-	-
	27	2 CP	2 Cél	No	-	No visto	Mórula	No	-	-
	28	2 CP	2 Cél	No	-	No visto	Mórula	No	-	-
	29	2 CP	2 Cél	No	-	No visto	Mórula	No	-	-
	30	2 CP	2 Cél	No	-	No visto	Mórula	No	-	-
	31	2 CP	2 Cél	No	-	No visto	Mórula	No	-	-



Tabla 10. Resultados semana 10. Recepción de 18 muestras FVB*CD-1.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	24/04/2017	25/04/2017	25/04/2017	25/04/2017	26/04/2017	27/04/2017	27/04/2017	27/04/2017	28/04/2017
	Téc	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam
CONTROL	1	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	2	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	3	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	4	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	5	2CP	2 Cél	-	-	No visto	4 Cél	-	-	No visto
	6	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	7	2CP	2 Cél	-	-	No visto	8 Cél	-	-	No visto
	8	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	9	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
	10	2CP	2 Cél	-	-	No visto	Mórula	-	-	No visto
PROTOCOLO	11	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	12	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	13	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	14	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	15	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	4 Cél	Sí	Sí	No visto
	16	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	17	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	Mórula	Sí	Sí	No visto
	18	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	-	-	-	No visto



Tabla 11. Resultados semana 11. Recepción de 33 muestras FVB*FVB.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	08/05/2017	09/05/2017	09/05/2017	09/05/2017	10/05/2017	11/05/2017			15/05/2017
	Téc	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam	Miriam
CONTROL	1	2CP	2 Cél	-	-	No visto	No visto	-	-	Degenerado
	2	2CP	2 Cél	-	-	No visto	No visto	-	-	Degenerado
	3	2CP	2 Cél	-	-	No visto	No visto	-	-	Degenerado
	4	2CP	2 Cél	-	-	No visto	No visto	-	-	Degenerado
	5	2CP	2 Cél	-	-	No visto	No visto	-	-	Degenerado
	6	2CP	2 Cél	-	-	No visto	No visto	-	-	Degenerado
	7	2CP	2 Cél	-	-	No visto	No visto	-	-	Degenerado
	8	2CP	2 Cél	-	-	No visto	No visto	-	-	2 Cél
	9	2CP	2 Cél	-	-	No visto	No visto	-	-	2 Cél
	10	2CP	2 Cél	-	-	No visto	No visto	-	-	Degenerado
PROTOCOLO	11	2CP	2 Cél	Sí	Sí	No visto	No visto	-	-	Degenerado
	12	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	13	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	14	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	15	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	16	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	17	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	18	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	19	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	20	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	21	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	22	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	23	2CP	2 Cél	Sí	No	No visto	No visto	-	-	-
	24	2CP	2 Cél	No	-	No visto	No visto	-	-	-
	25	2CP	2 Cél	No	-	No visto	No visto	-	-	-
	26	2CP	2 Cél	No	-	No visto	No visto	-	-	-
	27	2CP	2 Cél	No	-	No visto	No visto	-	-	-
	28	2CP	2 Cél	No	-	No visto	No visto	-	-	-
	29	2CP	2 Cél	No	-	No visto	No visto	-	-	-
	30	2CP	2 Cél	No	-	No visto	No visto	-	-	-
	31	2CP	2 Cél	No	-	No visto	No visto	-	-	-
	32	2CP	2 Cél	No	-	No visto	No visto	-	-	-
	33	2CP	2 Cél	No	-	No visto	No visto	-	-	-



Tabla 12. Resultados semana 12. Recepción de 20 muestras FVB*FVB.

		D1	D2	Vitrificado	Superv.	D3	D4	Vitrificado	Superv.	D5
	Fecha	15/05/2017	16/05/2017	16/05/2017	16/05/2017	17/05/2017	18/05/2017	18/05/2017	18/05/2017	19/05/2017
	Téc	Miriam	Miriam			Miriam	Miriam			Miriam
CONTROL	1	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	2	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	3	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	4	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	5	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	6	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	7	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	8	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	9	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	10	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
PROTOCOLO	11	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	12	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	13	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	14	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	15	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	16	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	17	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	18	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	19	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado
	20	2CP	Degenerado	-	-	Degenerado	Degenerado	-	-	Degenerado



Finalmente aplicamos nuestro método a 153 muestras biológicas, entre el estado correspondiente al día 2 y al día 4, y tras una valoración morfológica realizada según el protocolo de viabilidad comentado con anterioridad, sobrevivieron en total 114 muestras, es decir, obtuvimos una tasa de supervivencia del 74.5%. Además, se dejaron en cultivo embrionario 135 muestras, de las cuales sobrevivieron 101, así que obtuvimos una tasa de supervivencia del 74.8%.

Tabla 13. Tasa de supervivencia y de recuperación tras el procedimiento de desvitrificación.

Número total de muestras vitrificadas	Muestras supervivientes tras la desvitrificación (%)
153	114 (74,5%)

Nuestro proyecto tuvo una duración de 3 meses ya que las dos últimas semanas observamos que todas las muestras se degeneraron debido a la alta temperatura que se alcanzó en el laboratorio, con lo que se concluyó que para poder realizar nuestro experimento la temperatura no debía alcanzar los 25 °C.





6. Conclusión.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos experimentales realizados durante este periodo, se pueden destacar las siguientes conclusiones:

1. Se consigue eliminar por completo la contaminación de las muestras biológicas durante su inmersión en el nitrógeno líquido gracias al cierre hermético del sellado que hacen que la tasa de recuperación sea del 100 %.
2. Esta técnica excluye la necesidad de mantenimiento de equipos caros y de personal especializado para su aplicación.
3. Para poder realizar los ensayos es necesario que la temperatura en el laboratorio se encuentre entre los 23-25 °C, ya que de lo contrario las muestras no sobreviven.
4. La tasa de supervivencia obtenida en nuestro proyecto es similar a la alcanzada a otros sistemas que están publicados en la literatura.
5. Para evitar los fallos humanos y garantizar mayor precisión sería recomendable automatizar nuestra técnica.
6. En general los resultados obtenidos son muy satisfactorios ya que esta técnica representa una opción fiable en cuanto a recuperación, supervivencia y seguridad que harán que en un futuro se convierta en una herramienta clave en la práctica clínica diaria.





7. Bibliografía.

1. Criopreservación - Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. [cited 2020 May 29]. Available from: <https://es.wikipedia.org/wiki/Criopreservación>
2. Benavides F, Guénet JL. Biología y manejo reproductivo del ratón. Man genética roedores Lab Principios básicos y Apl. 2003;59–83.
3. Principios de Criobiología [Internet]. [cited 2020 May 30]. Available from: <https://www.bioterios.com/post.php?s=2013-05-01-principios-de-criobiologia>
4. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature. 1985 Feb 1;313(6003):573–5.
5. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Vol. 247, The American journal of physiology. Am J Physiol; 1984.
6. Yolanda Mínguez Y, Velasco JAG. Estado actual de la criopreservación. Rev Iberoam Fertil y Reprod Humana. 2012;29(2).
7. Descenso crioscópico - Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. [cited 2020 May 30]. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Descenso_crioscópico
8. Rivero González J. Modelado Matemático E Implementación Práctica De Sistema De Vitrificación Ultra-Rápida Mediante Radiación Láser. 2012;7–29. Available from: http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/12044/fichero/PROYECTO_COMPLETO.pdf
9. PROPIEDADES COLIGATIVAS [Internet]. [cited 2020 May 30]. Available from: <http://www.ehu.eus/biomoleculas/agua/coligativas.htm#po>
10. Vila L. Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. Biol Clin Hematol. 1984;6:227–36.
11. Boiso I. Principios básicos de Criobiología. Vol. 18, Congreso ASEBIR. 2001.
12. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology. 1977;14:251–72.
13. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. J Gen Physiol. 1963;47:347–69.
14. FUNDAMENTOS DE CRIOBIOLOGÍA ESPERMÁTICA PARA BANCOS DE SEMEN | Revista Asebir [Internet]. [cited 2020 May 30]. Available from: <https://revista.asebir.com/fundamentos-de-criobiologia-espermatologica-para-bancos-de-semen/>
15. Nei T. Mechanism of haemolysis of erythrocytes by freezing, with special



- reference to freezing at near-zero temperatures. 1970;131–47.
16. Paynter SJ, Fuller BJ SR. Temperature dependence of Kedem-Katchalsky membrane transport coefficients for mature mouse oocytes in the presence of ethylene glycol. 1999;39:169–76.
 17. Jones HW. Cryopreservation and its problems. Fertil Steril. 1990;53:780–4.
 18. Woods EJ, Benson JD, Agca Y CJ. Fundamental cryo-biology of reproductive cells and tissues. Cryobiology. 2004;48:146–56.
 19. Hunter J, Bernard A, Fuller B et al. Plasma membrane water permeabilities of human oocytes: the temperature dependance of water movement in individual cells. J Cell Physiol. 1992;150:175–9.
 20. Rall W, Reid D FJ. Innocuous biological freezing during warming. Nature. 1980;286:511–4.
 21. Leibo SP. Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. J Membr Biol. 1980;53:179–88.
 22. La criopreservación y sus aplicaciones clínicas. [Internet]. [cited 2020 May 30]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395684/>
 23. García J VL. Criopreservadores: concepto y manejo. Biol Clin Hematol. 1984;6:219–25.
 24. Polge C, Smith A.U PA. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature. 1949;
 25. Lovelock JE BM. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. Nature. 1959;183:1394–5.
 26. Z H. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003;46:205–29.
 27. Vajta G KM. Improving cryopreservatio systems. Theriogenology. 2006;65:236–44.
 28. Trad FS, Toner M BJ. Effects of cryoprotectants and ice-seeding temperature on intracellular freezing and survival of hu-man oocytes. Hum Reprod. 1999;14:1569–77.
 29. Doctoral T. Validación y desarrollo de un sistema de vitrificación completamente cerrado en el modelo animal de ratón. 2017;
 30. Porcu E, Fabri R, Damiano G et al. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. Mol Cell Endocrinol. 2000;169:33–7.
 31. Fabri R, Porcu E, Marsella T et al. Human oocyte cryopreservation: new



- perspective regarding oocyte survival. *Hum Reprod.* 2001;16(411–416).
32. Ashwood Smith MJ, Morris GW, Fowler R et al. Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Hum reprod.* 1988;3:795–801.
 33. Hunter JE, Fuller BJ, Bernard A et al. Fertilization of human and mouse oocytes after exposure to low temperature and osmotic stress. *Cryobiology.* 1990;27:647–8.
 34. Hunter JE, Bernard A, Fuller BJ et al. The osmotic response of human and mouse oocytes following cooling: evidence of altered morphological characteristics. *Cryo Lett.* 1990;11:307–14.
 35. Ludwig M, Al-Hasani S, Felberbaum R et al. New aspects of cryopreservation of oocytes and embryos in assisted reproduction and future perspectives. *Hum Reprod.* 1999;14:162–85.
 36. Goud A, Goud P, Qian C et al. Cryopreservation of human germinal Vehicle stage in Vitro matured MII oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilizations, and early cleavage divisions. *Fertil Steril.* 2000;74:487–94.
 37. Paynter SJ, Borini A, Bianchi V et al. Volume changes of mature human oocytes on exposure to cryoprotectant solutions used in slow cooling procedures. *Hum Reprod.* 2005;20:1194–9.
 38. Boldt J, Tidswell N, Sayers A et al. Human oocyte cryopreservaction: 5-years experience with a sodium-depleted slow freezing method. *Reprod Biomed Online.* 2006;13:96–100.
 39. Bianchi V, Coticchio G, Distratis V et al. A differential sucrose concentration during dehydration (0.2mol/l) and rehydration (0.3mol/l) increases the implantation rate of frozen human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2007;14:64–71.
 40. De Santis L, Cini I, Coticchio G et al. Objective evaluation of the viability of cryopreserved oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2007;15:338–45.
 41. Azumbaje R, Petracco A, Okada L et al. Experience of freezing human oocytes using sodium-depleted media. *Reprod Biomed On-line.* 2011;22:83–7.
 42. Bianchi V, Lappi M, Bonu MA et al. Oocyte slow freezing using a 0.2-0.3M sucrose concentration protocol: is it really the time to trash the cryopreservation machine. *Fertil Steril.* 2012;97:1101–7.
 43. JE L. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta.* 1953;10(3):414–26.
 44. Smith GD, Motta EE SP. Theoretical and experimental basis of oocyte



- vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2011;23:298–306.
45. Fuller B PS. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online*. 2004;9:680–91.
 46. Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2008;90(1):189–93.
 47. Kong IK., Lee SI, Cho SG, Cho SK PC. Comparison of open pulled straw (OPS) vs. glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*. 2000;53:1817–182.
 48. Misumi K, Suzuki M, Sato S SN. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology*. 2003;60:253–60.
 49. García JI, Noriega-Portella L N-HL. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Hum Reprod*. 2011;0:1–9.
 50. Lieberman J TM. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation on day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril*. 2006;86:20–6.
 51. Stachecki J, Garrisi J, Sabino S et al. A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:360–7.
 52. Van Landuyt L, Stoop D, Verheyen G et al. Outcome of closed blastocyst vitrification in relation to blastocyst quality: evaluation of 759 warming cycles in a single-embryo transfer policy. *Hum Reprod*. 2011;26:527–33.
 53. Zhu D, Zhang J, Cao S et al. Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles-time for a new embryo transfer strategy. *Fertil Steril*. 2011;95:1691–5.
 54. P CT. WO 2014/057148 A2. Vol. 10. 2012 Oct.
 55. Gallardo M, Hebles M, Migueles B, Dorado M, Aguilera L, González M, et al. Thermal and clinical performance of a closed device designed for human oocyte vitrification based on the optimization of the warming rate. *Cryobiology*. 2016;73(1):40–6.
 56. Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*. 2014;81(1):96–102.
 57. Vajta G, Rienzi L UF. Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed*. 2015;30(4):325–33.



58. Arav A, Zeron Y OA. A new device and method for Vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 2000;53:248–9.
59. M K. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*. 2007;67(1):73–80.
60. Seki S MP. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology*. 2009;59:75–82.
61. Cobo A, Bellver J, de los Santos MJ RJ. Viral screening of spent culture media and liquid nitrogen samples of oocytes and embryos from hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus chronically infected women undergoing in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*. 2012;97(1):74–8.
62. Muthukumar K, Mangalaraj AM, Kamath MS GK. Blastocyst cryopreservation: vitrification or slow freeze. *Fertil Steril*. 2008;90(S426):7.
63. Arav A, Gianaroli L, Bafaro G DL. A new vitrification technique for 8-cell stage mouse embryos. *IVF Meet*. 1987;118.
64. Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H SE. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*. 2001;42(2):139–44.
65. Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O NT. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *J Reprod Dev*. 2004;50(6):685–96.
66. Hamawaki A, Kuwayama M HS. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology*. 1999;51:165.
67. Kuwayama M, Vajta G, Ieda S KO. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 2005;11(5):608–14.
68. Panagiotidis Y, Vanderzwalmen P, Prapas Y, Kasapi E, Goudakou E, Papatheodorou A, Passadaki T, Petousis S, Veletza S, Nikolettos N, Prapas N MG. Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte donation programme: a prospective randomized study. *Reprod Biomed*. 2013;26:470–6.
69. Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y PN, Zikopoulos K, Georgiou I PY. Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling oocyte study. *Reprod Biomed*. 2013;26:595–602.
70. Vajta G, Holm P, Greve T CH. Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta Vet Scand*. 1997;38(4):349–52.
71. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T et al. Open Pulled



- Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.* 1998;51(1):53–8.
72. Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN YY. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod.* 2001;16(11):2350–6.
 73. Risco R, Elmoazzen H, Doughty M, He X TM. Thermal performance of quartz capillaries for vitrification. *Cryobiology.* 2007;55(3):222–9.
 74. SafeSealer [Internet]. Available from: <https://safepreservation.es/es/selladora-safespeed/>
 75. Arav A. Vitrification of oocytes and embryos. DVM Thesis Bol Bol Univ. 1989;
 76. F Fuentes, R Mendoza, A Rosales, A Cisneros. Guia de manejo y cuidado de animales de laboratorio:Raton [Internet]. Instituto nacional de salud. 2008. 1–54 p. Available from: www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA_ANIMALES_RATON.pdf
 77. Crespo Alonso M. Evolución del blastocisto del ratón. Mecanismos de especificación de los primeros linajes. Tesis Dr [Internet]. 2008;115. Available from: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/3140/5282_crespo_alonso_miguel.pdf?sequence=1
 78. Kondo I, Suganuma N, Ando T, Asada Y, Furuhashi M, Tomoda Y. Clinical factors for successful cryopreserved- thawed embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* 1996;13:201–6.
 79. Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers R. A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful successful embryo cryopreservation program. *Fertil Steril.* 1993;59:1070–4.
 80. Asebir G, Decreto R. Congelación embrionaria. 2006;319–28.
 81. El dispositivo de medición de Labotect mide especialmente la atmósfera de la incubadora [Internet]. [cited 2020 May 30]. Available from: <https://www.labotect.com/products/measuring-device>



8. Anexos.

CALENDARIO

- **Semana 1**
 - Día 1: Se reciben 30 muestras FVB*FVB, de las cuales 15 se dejan para el grupo control y las otras 15 para el grupo experimental.
 - Día 2: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras del grupo experimental, vitrificándose 15 muestras de las cuales sobrevivieron 10.
 - Día 3: Observación del desarrollo morfológico.
 - Día 4: Observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.
 - Día 5: Nada.

- **Semana 2**
 - Día 1: Se reciben 29 muestras FVB*FVB, de las cuales 15 se dejan para el grupo control y las otras 14 para el grupo experimental.
 - Día 2: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras del grupo experimental, vitrificándose 13 muestras de las cuales sobrevivieron 10.
 - Día 3: Observación del desarrollo morfológico.
 - Día 4: Observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.
 - Día 5: Nada.

- **Semana 3**
 - Día 1: Se reciben 20 muestras FVB*FVB, de las cuales 10 se dejan para el grupo control y las otras 10 para el grupo experimental.
 - Día 2: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras del grupo experimental, vitrificándose 10 muestras de las cuales sobrevivieron 6.
 - Día 3: Nada.
 - Día 4: Observación del desarrollo morfológico.
 - Día 5: Observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.



- **Semana 4**
 - Día 1: Se reciben 20 muestras FVB*FVB, de las cuales 10 se dejan para el grupo control y las otras 10 para el grupo experimental.
 - Día 2: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras del grupo experimental, vitrificándose 10 muestras de las cuales sobrevivieron 7.
 - Día 3: Observación del desarrollo morfológico.
 - Día 4: Observación del desarrollo morfológico.
 - Día 5: Observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.

- **Semana 5**
 - Día 1: Se reciben 30 muestras FVB*CD-1, de las cuales 15 se dejan para el grupo control y las otras 15 para el grupo experimental.
 - Día 2: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras del grupo experimental, vitrificándose 12 muestras de las cuales sobrevivieron 11.
 - Día 3: Observación del desarrollo morfológico.
 - Día 4: Observación del desarrollo morfológico.
 - Día 5: Observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.

- **Semana 6**
 - Día 1: Se reciben 20 muestras FVB*FVB, de las cuales 10 se dejan para el grupo control y las otras 10 para el grupo experimental.
 - Día 2: Observación del desarrollo morfológico. Se contempló que todas las muestras, tanto del grupo control como experimental estaban degeneradas debido a que nos quedamos sin oxígeno en el laboratorio.
 - Día 3: Observación del desarrollo morfológico.
 - Día 4: Observación del desarrollo morfológico.
 - Día 5: Observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.



- **Semana 7**
 - Día 1: Se reciben 30 muestras FVB*CD-1, de las cuales 10 se dejan para el grupo control y las otras 20 para el grupo experimental.
 - Día 2: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras del grupo experimental, vitrificándose 14 muestras de las cuales sobrevivieron 12.
 - Día 3: Nada.
 - Día 4: Observación del desarrollo morfológico.
 - Día 5: Observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.

- **Semana 8**
 - Día 1: Se reciben 32 muestras FVB*FVB, de las cuales 10 se dejan para el grupo control y las otras 22 para el grupo experimental.
 - Día 2: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras del grupo experimental, vitrificándose 15 muestras de las cuales sobrevivieron 11.
 - Día 3: Nada
 - Día 4: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras vitrificadas que sobrevivieron en el día 2, vitrificándose 10 muestras de las cuales sobrevivieron 7.
 - Día 5: Destrucción de las muestras.

- **Semana 9**
 - Día 1: Se reciben 31 muestras FVB*CD-1, de las cuales 10 se dejan para el grupo control y las otras 21 para el grupo experimental.
 - Día 2: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras del grupo experimental, vitrificándose 13 muestras, sobreviviendo todas ellas.
 - Día 3: Nada
 - Día 4: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras vitrificadas que sobrevivieron en el día 2, vitrificándose 13 muestras de las cuales sobrevivieron 12.
 - Día 5: Observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.



- **Semana 10**

- Día 1: Se reciben 18 muestras FVB*CD-1, de las cuales 10 se dejan para el grupo control y las otras 8 para el grupo experimental.
- Día 2: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras del grupo experimental, vitrificándose 8 muestras de las cuales sobrevivieron 7.
- Día 3: Nada
- Día 4: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras vitrificadas que sobrevivieron en el día 2, vitrificándose 7 muestras, sobreviviendo todas ellas.
- Día 5: Destrucción de las muestras.

- **Semana 11**

- Día 1: Se reciben 33 muestras FVB*FVB, de las cuales 10 se dejan para el grupo control y las otras 23 para el grupo experimental.
- Día 2: Observación del desarrollo morfológico y realización del protocolo a las muestras del grupo experimental, vitrificándose 13 muestras de las cuales sobrevivieron solo una.
- Día 3: Nada
- Día 4: Nada
- Día 5: Observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.

Esta semana se degeneraron todas las muestras debido a la alta temperatura que se alcanzó en el laboratorio.

- **Semana 12**

- Día 1: Se reciben 20 muestras FVB*FVB, de las cuales 10 se dejan para el grupo control y las otras 10 para el protocolo experimental.
- Día 2: Observación del desarrollo morfológico.
- Día 3: Observación del desarrollo morfológico.
- Día 4: Observación del desarrollo morfológico.
- Día 5: Observación del desarrollo morfológico y destrucción de las muestras.

Esta semana se degeneraron todas las muestras debido a la alta temperatura que se alcanzó en el laboratorio.

