



Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2022; 12:1-21. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.18>  
Revisión de Literatura. Recibido: 22/12/2021. Aceptado:11/06/2022. Publicado:01/08/2022. Clave:e2021-88.  
<https://www.youtube.com/watch?v=GEqdYYBdL7M>

## Colección, vitrificación y transferencia post-calentamiento de embriones equinos producidos in vivo: una revisión de literatura

Collection, vitrification and post-warming transfer of equine embryos produced in vivo: a literature review



Christian Urías-Castro<sup>\*1ID</sup>, Myriam Boeta-Acosta<sup>2 ID</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, México. <sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. México. \*Autor de correspondencia: Christian Urías-Castro, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa. Boulevard San Ángel S/N, Fraccionamiento San Benito, Predio Las Coloradas, Culiacán, Sinaloa, México. Email: cesar.urias@uas.edu.mx, amyriam@unam.mx

### Resumen

Embriones equinos pequeños, iguales o menores a trescientos micrómetros de diámetro ( $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$ ) son obtenidos antes del día siete post ovulación (PO). Embriones grandes, mayores a trescientos micrómetros de diámetro ( $>300 \mu\text{m}\varnothing$ ) son recuperados durante o después del día siete PO. No existen experimentos que prueben hasta qué punto los medios de lavado y de colección embrionaria influyen en la sobrevivencia post vitrificación. Mas conocimiento es necesario acerca de las mezclas de crioprotectores; penetrantes o no penetrantes y el efecto que ejercen sobre el índice de sobrevivencia embrionaria post vitrificación y el índice de gestación (ISEP-VIG). El tipo de porta embrión, el tamaño del embrión y el volumen de la solución vitrificante varían entre embriones pequeños y grandes. Un índice de transferencia de temperatura (ITT) elevado optimiza en ISEP-VIG. El tipo de soluciones de mantenimiento y transferencia utilizadas durante la post-vitrificación es un área escasamente explorada. El propósito de este estudio es proveer información para ayudar en la adaptación de protocolos de vitrificación dependiendo en el tamaño del embrión. Un objetivo adicional es facilitar el acceso a información acerca de soluciones empleadas antes y durante la vitrificación; así como las soluciones usadas durante las etapas de calentamiento y transferencia embrionaria.

**Palabras Clave:** soluciones líquidas, colección de embriones, vitrificación, calentamiento, transferencia embrionaria, yeguas, burras.

### Abstract

Small equine embryos, equal or smaller than three hundred micrometers in diameter ( $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$ ) are collected before the seventh post ovulation (PO) day. Big embryos, larger than three hundred micrometers ( $>300 \mu\text{m}\varnothing$ ) are recovered during or after the seventh PO day. No experiments test the type of holding and washing solutions and to what extent they influence the embryo post vitrification survival. Further knowledge is needed about the mixture of cryoprotectants; either penetrating or non penetrating and the effect they exert over the embryos post vitrification survival and pregnancy rate (PVSPR). The type of embryo carrier, the size of the embryo and the volume of the vitrification solution vary between small and large embryos. A high temperature transfer index (TTI) optimizes the embryo PVSPR. In equids, the type of holding and transfer solutions used during the post vitrification step is an area scarcely explored. This study endeavors to provide information to help in the adaptation of vitrification protocols depending on the embryo size. An additional objective is to ease the access to data about the solutions employed before and during the vitrification; as well as the solutions used during the embryo warming and transfer steps.

**Keywords:** liquid solutions, embryo collection, vitrification, warming, embryo transfer, mares, jennies.



## INTRODUCCIÓN

Múltiples factores pueden ser tomados en consideración para establecer programas de vitrificación exitosos y obtener altos ISEPVIG. En yeguas/burras una determinación exacta de la ovulación es crítica ya que esto permite la recuperación de embriones con el tamaño esperado. Si son pequeños, no requerirán la perforación de su cápsula embrionaria (Panzani *et al.*, 2012a; Fanelli *et al.*, 2020). Sin embargo, si son grandes requerirán preferentemente ser puncionados antes de su vitrificación (Hochi *et al.*, 1995; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Scherzer *et al.*, 2011; Wilsher *et al.*, 2019; Fanelli *et al.*, 2020; Wilsher *et al.*, 2021). En general, el día PO seleccionado para intentar recuperar el embrión repercute en el porcentaje de embriones colectados. La recuperación exitosa de embriones equinos es influenciada por múltiples factores: edad, número de ciclos de la donadora (Dorado *et al.*, 2020), si el semen usado es fresco, refrigerado, o congelado (Meadows *et al.*, 2000), tiempo de inseminación relativo a la ovulación (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005), época del año; en yeguas, pero no en burras (Pérez-Marín *et al.*, 2017; Dorado *et al.*, 2020), número de ovulaciones por ciclo; individual o múltiple (Squires *et al.*, 1985), fertilidad del caballo o burro (Pérez-Marín *et al.*, 2017; Dorado *et al.*, 2020) y otros factores (Allen *et al.*, 1985). En la mayoría de los casos el promedio de recuperación embrionaria es mayor de cincuenta por ciento; sin importar si su intento de colección se realiza ya sea el día sexto, séptimo, octavo, o noveno PO (Allen *et al.*, 1985; Freeman *et al.*, 1991; Hinrichs, 1990; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005).

Sin embargo, la visualización y manipulación del embrión equino son más fácil después del día séptimo PO; debido a su mayor tamaño cuando se compara con embriones colectados ya sea durante los días seis, o seis y medio PO. Un número pequeño de estudios comparan el porcentaje de preñez obtenidos con embriones cuando se usan distintos medios líquidos de colección (Oguri & Tsutsumi, 1974), lavado, mantenimiento (Oguri & Tsutsumi, 1974), y transferencia (Carnavale *et al.*, 2000; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005). La información también es escasa cuando se compara las distintas soluciones vitrificantes y el porcentaje de preñez logrado cuando se emplean cada una de ellas. Hay muchas opciones que pueden ser seleccionadas como porta embriones entre ellas están el open pulled straw o OPS (Guignot *et al.*, 2015); la micro-pipeta de diámetro fino (Choi *et al.*, 2011); el cryolock (Díaz *et al.*, 2016; Ferris *et al.*, 2016; Wilsher *et al.*, 2019); hemi straw (Sanchez *et al.*, 2017), el Fibreplug-solid surface (Pérez-Marín *et al.*, 2018) y el cryotop (Bottrel *et al.*, 2019; Bottrel *et al.*, 2020a; Bottrel *et al.*, 2020b). Los embriones equinos pequeños no requieren contacto directo con el nitrógeno líquido para sobrevivir el proceso de criopreservación aun si se vitrifican en un volumen grande de solución p.ej. 30 micro litros (uL) (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Fanelli *et al.*, 2020). Por otro lado, si los embriones equinos son grandes, aparte de la perforación de su capsula (Wilsher *et al.*, 2021) y la extracción de su líquido blastocélico (Sanchez *et al.*, 2017; Herrera, 2021) preferentemente requerirán contacto directo con el nitrógeno líquido (Díaz *et al.*,



2016; Sanchez *et al.*, 2017; Herrera, 2021). Al parecer cuando se trabaja con embriones equinos grandes (aparte de la perforación de su cápsula y la extracción de su líquido blastocélico), cuando se compara entre los sistemas abiertos y cerrados los cuales permiten el contacto directo e indirecto con el nitrógeno líquido durante la etapa de vitrificación; que los sistemas abiertos permiten un ITT mayor por lo que se aumenta el ISEPVIG (Sanchez *et al.*, 2017). Además, el volumen de líquido usado para mantener embriones grandes durante la etapa de vitrificación debe preferentemente ser pequeño (usualmente < 1 uL) para incrementar el ITT (Díaz *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2017). Otro factor que debe influenciar la sobrevivencia embrionaria es el diámetro de la micro pipeta empleada para perforar su cápsula; sin embargo, existen datos limitados y no claros acerca de este tema (Choi *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2016; Ferris *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2017; Wilsher *et al.*, 2021). Finalmente, las soluciones líquidas seleccionadas para transferir el embrión al útero de la yegua o burra deben ser analizado de manera cuidadosa. Mas investigación es requerida en el área de reproducción y criobiología donde los embriones equinos son un modelo fácil para trabajar; ya que estos se pueden coleccionar de manera fácil, manipularse y transferirse de regreso al útero de yeguas, burras, mulas y/o burdéganas. El objetivo del presente estudio es proveer una guía fácil acerca de los factores relevantes asociados con la vitrificación embrionaria, ambos: en yeguas y burras, establecer áreas donde existe información limitada o es ausente, y promover ideas que ayuden a realizar investigaciones futuras en el área de criobiología y reproducción equina.

### **Porcentaje de embriones recuperados en yeguas y burras en relación al día de ovulación**

Existe mucha variación en el porcentaje de embriones coleccionados en yeguas cuando se toma como consideración el día en el cual se intenta recuperarlos. Por ejemplo; en el sexto, séptimo, u octavo día PO el porcentaje de recuperación reportado varía de cero (Battut *et al.*, 1997), sesenta y dos (Camillo *et al.*, 2003), a cien por ciento (Hochi *et al.*, 1995) respectivamente. Sin embargo, porcentajes de recuperación cercanos o mayores a cincuenta por ciento son indicados por la mayoría de los estudios (Allen *et al.*, 1985; Iuliano *et al.*, 1985; Squires *et al.*, 1985; Hinrichs, 1990; Freeman *et al.*, 1991; Hochi *et al.*, 1995; Maclellan *et al.*, 2002; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Moussa *et al.*, 2005; Derbala & Abdou, 2017; Silva *et al.*, 2018; Roser *et al.*, 2020). Cuando la colección embrionaria se intenta temprano (día sexto PO), el porcentaje de recuperación varía de cero (Battut *et al.*, 1997) a ochenta y dos por ciento (Hochi *et al.*, 1995). La dramática diferencia previa entre reportes podría ser parcialmente atribuida a la experiencia del personal ya que la búsqueda y observación embrionaria son más difíciles durante la etapa de desarrollo temprano (día sexto PO) cuando el tamaño del embrión es usualmente  $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$ . Aunque no es posible hacer comparaciones directas en el porcentaje de recuperación promedio debido a la diferencia de metodología y número de animales usados en cada estudio, en general;



se muestra que el porcentaje de colección exitoso tiende a ser menor cuando se intenta temprano (día sexto PO comparado con días posteriores). Interesantemente, ha sido posible incrementar el porcentaje de recuperación embrionaria mediante modificaciones en la técnica de colección; por ejemplo, permitiendo que la solución líquida de flushing o recuperación permanezca unos minutos más dentro del útero (Hinrichs, 1990; Alvarenga *et al.*, 1993).

Aparte de mostrar un alto grado de variación, los datos relacionados con el porcentaje de recuperación embrionaria por día son muy limitados en burras (Allen *et al.*, 1985; Vendramini *et al.*, 1997; Camillo *et al.*, 2010; Peña-Alfaro *et al.*, 2014; Bottrel *et al.*, 2017; Pérez-Marín *et al.*, 2017; Ottmann *et al.*, 2018; Dorado *et al.*, 2020). Durante el día sexto PO, el porcentaje de recuperación embrionaria varía de cuarenta y tres (Vendramini *et al.*, 1997) a setenta y cinco (Dorado *et al.*, 2020). En el día siete PO, la recuperación reportada va del doce (Camillo *et al.*, 2010) a ochenta por ciento (Dorado *et al.*, 2020). Alternativamente, si se intenta recuperar el embrión ya sea el día ocho o el día nueve PO, el porcentaje de recuperación embrionaria es por lo general superior al cincuenta por ciento (Camillo *et al.*, 2010; Peña-Alfaro *et al.*, 2014; Dorado *et al.*, 2020). Como se mencionó previamente, el porcentaje de recuperación embrionaria en équidos puede ser influenciado por muchos factores tales como el número de ciclos estrales de la donadora (Dorado *et al.*, 2020), el tipo de semen utilizado para inseminar a la hembra (Meadows *et al.*, 2000), la relación entre el tiempo de inseminación y el tiempo de ovulación (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005), la época del año en yeguas pero no en burras (Pérez-Marín *et al.*, 2017; Dorado *et al.*, 2020), el número de ovulaciones por ciclo estral (Squires *et al.*, 1985), la fertilidad de los machos utilizados (Pérez-Marín *et al.*, 2017; Dorado *et al.*, 2020) entre otros (Allen *et al.*, 1985).

### **La relación entre el día de recuperación y el tamaño del embrión**

En yeguas, el tamaño del embrión es influenciado de manera dramática por el día PO seleccionado para implementar su recuperación (Betteridge *et al.*, 1982; Hochi *et al.*, 1995; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2010; McCue *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2016; Guignot *et al.*, 2016; Wilsher *et al.*, 2019). Por lo general, si el embrión es colectado ya sea durante el día sexto o sexto y medio PO, este será  $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$  (Iuliano *et al.*, 1985; Freeman *et al.*, 1991; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Hudson *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2010; Guignot *et al.*, 2015; Pérez-Marín *et al.*, 2017; Pérez-Marín *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). Por el contrario, cuando la recuperación embrionaria se realiza durante el día siete, siete y medio; ocho, ocho y medio; o nueve, estos por lo general serán  $>300 \mu\text{m}\varnothing$  (Hochi *et al.*, 1995; McCue *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2016; Pérez-Marín *et al.*, 2017; Wilsher *et al.*, 2019).

Estudios en burras que describan la relación entre el tamaño del embrión y el día durante el cual fueron colectados son escasos. Sin embargo, parece que contrario a lo reportado en yeguas un alto porcentaje de los embriones colectados durante el día séptimo, o séptimo y medio PO son todavía  $< 300 \mu\text{m}\varnothing$  (Vendramini *et al.*, 1997; Panzani *et al.*, 2012b; Bottrel *et al.*, 2017; Pérez-Marín *et al.*, 2017; Pérez-Marín *et*



*al.*, 2018; Bottrel *et al.*, 2019; Bottrel *et al.*, 2020b; Dorado *et al.*, 2020; Fanelli *et al.*, 2020). Cuando la colección del embrión burro es intentada ya sea el día ocho PO o posteriormente, su diámetro es usualmente cercano a o mayor a 500  $\mu\text{m}\varnothing$  (Panzani *et al.*, 2012a; Pérez- Marín *et al.*, 2017; Bottrel *et al.*, 2019; Dorado *et al.*, 2020).

### **Protocolos que incluyen o excluyen la punción de la cápsula embrionaria (CE) antes de la vitrificación**

La cápsula no requiere ser puncionada antes del proceso de vitrificación si el tamaño del embrión caballo es  $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$ , y el ISEPVIG obtenido con estos embriones es usualmente superior al treinta por ciento (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Hudson *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2011; Analizado previamente por Urías-Castro & Boeta, 2020). La mayoría de los reportes acerca de la vitrificación de embriones equinos indican que cuando el embrión caballo es  $>300 \mu\text{m}\varnothing$  este deberá ser puncionado para perforar su CE y además su líquido blastocélico extraído para optimizar el ISEPVIG (Choi *et al.*, 2011; Guignot *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2016; Ferris *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2017; Wilsher *et al.*, 2019; Analizado previamente por Urías-Castro & Boeta, 2020). Sin embargo, cuando se toman en consideración más categorías en términos de tamaño embrionario; se observa que la vitrificación de embriones equinos de entre 300 y 550  $\mu\text{m}\varnothing$  de tamaño ( $\leq 550 \mu\text{m}\varnothing$ ); la perforación de la CE sin aspiración de su líquido blastocélico resulta en porcentajes de gestación superiores al 75% (Wilsher *et al.*, 2021).

Estudios que reporten el ISEPVIG cuando se usan embriones burro son escasos. El trabajo disponible muestra que la vitrificación de embriones burro  $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$  resulta en porcentajes de gestación que varían de treinta y seis por ciento al día catorce de gestación (D14), a veintisiete por ciento al día veinticinco de gestación (D25); lo que sugiere que si el embrión burro es  $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$ , la punción de la CE y la extracción del líquido blastocélico no son esenciales (Panzani *et al.*, 2012b). Proyectos de investigación que describan la punción de la CE de embriones burro y la extracción de su líquido blastocélico son limitados (Ottmann *et al.*, 2018). La pregunta de si los embriones burro  $>300 \mu\text{m}\varnothing$  requieren la punción de la CE y extracción del líquido blastocélico para incrementar el ISEPVIG ha sido contestada de manera indirecta solamente, ya que la punción de la CE y la extracción del líquido blastocélico resultaron en un porcentaje alto de sobrevivencia embrionaria in vitro (Ottmann *et al.*, 2018; previamente analizado por Urías-Castro & Boeta, 2020).

### **Infusión intrauterina de soluciones líquidas para coleccionar embriones equinos**

Algunos de los primeros estudios en describir la colección de embriones equinos reportaban el uso de solución salina fisiológica, esta última contenía dos por ciento de polvo de gelatina (Oguri & Tsutsumi, 1974). Hoy en día, el uso de lactato de Ringer (Alvarenga *et al.*, 1993; Barfield *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2017; Wilsher *et al.*, 2019); cuya composición es cercana a la solución Hartmann también ha sido descrita (Guignot *et al.*, 2015). Otra solución líquida empleada para recuperar embriones



equinos es la solución salina buferada con fosfato Dulbeccos o DPBS/PBS (Alvarenga *et al.*, 1993; Landim E Alvarenga *et al.*, 1993). Una solución salina buferada con fosfato Dulbeccos modificada (DMPBS) combinada con suero fetal de Becerra (FCS) ha sido reportada por Hinrichs (1990). La DMPBS puede ser suplementada con suero inactivado por calor de torete castrado (McKinnon & Squires, 1988); o albumina de suero bovino (BSA) más antibióticos (Battut *et al.*, 1997). La DMPBS mezclada ya sea con uno por ciento de FCS o suero de becerra más glucosa y piruvato, ha sido descrita también como una solución líquida para recuperar embriones equinos (Carnavale *et al.*, 2000). La solución flushing de tipo comercial Emcare® (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005) y la solución flushing Vigro® (Hudson *et al.*, 2006) son otras alternativas reportadas como soluciones líquidas para recuperar embriones.

En burras, la solución de lactato de Ringer es la reportada más frecuentemente como solución de recuperación embrionaria (Panzani *et al.*, 2012a; Peña-Alfaro *et al.*, 2014; Panzani *et al.*, 2016; Pérez-Marín *et al.*, 2018; Bottrel *et al.*, 2019; Bottrel *et al.*, 2020a; Bottrel *et al.*, 2020b). Otra alternativa reportada es la DPBS (Camillo *et al.*, 2010).

### **Soluciones líquidas usadas para mantener los embriones equinos recuperados**

Las soluciones de mantenimiento más simples en términos de composición son ya sea la solución salina con dos por ciento de polvo de gelatina, o la solución de lactato de Ringer con suero de yegua (1:1, v/v) y con mil unidades internacionales de penicilina por mililitro (Oguri & Tsutsumi, 1974). Una alternativa más completa en términos de composición es el medio de Ham F10, este último es complementado con diez por ciento de FCS más uno por ciento de penicilina/estreptomicina; este medio es gasificado con cinco por ciento de dióxido de carbono, oxígeno, y noventa por ciento de nitrógeno (Carnavale *et al.*, 2000). Los medios de mantenimiento comercial Vigro® (Hudson *et al.*, 2006) y Syngro® (Barfield *et al.*, 2009) también han sido descritos. Investigadores franceses han trabajado con el medio EHM, el cual es una solución líquida a base de PBS que contiene cuatro gramos de BSA por litro (Guignot *et al.*, 2015). Investigadores de la Universidad del estado de Colorado han reportado la utilización del medio DMEM/F12 (sales inorgánicas, aminoácidos, vitaminas, antibióticos y otros) suplementado con veinte por ciento de suero fetal bovino – DMEM/F12/FBS (Ferris *et al.*, 2016). El DMPBS sin calcio y magnesio, complementado con diez por ciento de FBS y cincuenta microgramos de gentamicina por mililitro ha sido empleado por Sánchez *et al.* (2017). Alternativamente, el medio M-199 Hepes suplementado con diez por ciento de FBS más uno por ciento de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina) ha sido descrito como una solución líquida para mantener embriones (Wilsher *et al.*, 2019).

El PBS y el lactado de Ringer han sido reportados como medios de mantenimiento para embriones burro (Camillo *et al.*, 2010). El uso de la solución comercial Emcare Holding Solution® está documentada también por varios investigadores como solución de mantenimiento para embriones burro (Camillo *et al.*, 2010; Panzani *et al.*, 2012a). Otra alternativa usada como solución de mantenimiento con embriones burro es la



Vitrocell<sup>®</sup>, la cual contiene cero punto cuatro por ciento de BSA (Peña-Alfaro *et al.*, 2014). El medio de mantenimiento Syngro<sup>®</sup> ha sido empleado con embriones burro antes de transferirlos al útero de mulas (Bottrel *et al.*, 2017). El uso de un medio de mantenimiento isotónico (IVM-Technologies) ha sido reportado por Pérez-Marín *et al.* (2018). Recientemente, Bottrel y su equipo ha reportado el uso de TCM-199 HEPES complementado con veinte por ciento de FCS como un medio de mantenimiento para embriones burro (Bottrel *et al.*, 2019).

### **Medio para el lavado y manipulación embrionaria**

Una solución líquida que ha sido empleada en yeguas para lavar y manipular los embriones colectados es la PBS; esta es usualmente suplementada con suero de origen animal como el suero fetal de becerro FCS (Alvarenga *et al.*, 1993). El uso de PBS sin calcio y magnesio, suplementada con piruvato de sodio, glucosa, y FCS ha sido documentada por Eldridge-Panuska *et al.* (2005). Una solución de PBS que contiene albumina de suero bovino (BSA) también es reportada como un medio para lavar/manipular embriones (Guignot *et al.*, 2015). Otras opciones para el lavado de embriones son la solución Vigro<sup>®</sup> (Hudson *et al.*, 2006; Barfield *et al.*, 2008) y el medio Syngro<sup>®</sup> (Barfield *et al.*, 2009). El uso de DMEM/F12 suplementado con veinte por ciento de suero fetal bovino (FBS) ha sido reportado por Ferris *et al.* (2016). Una solución denominada Dulbecco's PBS (DPBS) con diez por ciento de FCS ha sido empleada para lavar embriones equinos por los investigadores de la universidad del estado de Colorado (Carnavale *et al.*, 2000). Otro medio para lavar embriones que ha sido documentado es el M-199 HEPES, este último conteniendo diez por ciento de FBS, penicilina y estreptomina (Wilsher *et al.*, 2019).

Para embriones de asnos, la Emcare Holding Solution<sup>®</sup> ha sido descrita de manera frecuente para lavar/manipular embriones (Camillo *et al.*, 2010; Panzani *et al.*, 2012a; Panzani *et al.*, 2012b; Panzani *et al.*, 2016). El medio de mantenimiento Syngro<sup>®</sup> es empleado como solución de lavado embrionario por varios investigadores (Bottrel *et al.*, 2017; Pérez-Marín *et al.*, 2017; Bottrel *et al.*, 2019; Bottrel *et al.*, 2020a; Bottrel *et al.*, 2020b). Alternativamente, el PBS (Camillo *et al.*, 2010), el lactato de Ringer (Camillo *et al.*, 2010), y el medio de mantenimiento isotónico han sido descritos también como soluciones para el lavado embrionario en asnos (Pérez-Marín *et al.*, 2018).

### **Tamaño de la micro-pipeta y punción de la cápsula embrionaria (CE)**

No hay estudios que de manera formal correlacionen en tamaño de la punta de la micro-pipeta usada para perforar la CE y su asociación con el ISEPVIG. La mayoría de los experimentos donde se punciona la CE son diseñados con puntas de micro-pipeta iguales o menores a los dieciséis micrómetros de diámetro ( $\mu\text{m}\varnothing$ ); tal como ha sido descrito en distintos estudios (Choi *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011; Hinrichs & Choi, 2012; Guignot *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2017). Solo un par de investigadores han demostrado la sobrevivencia embrionaria como reflejo de los



porcentajes de gestación, después de puncionar la CE con puntas de micro-pipetas mayores a los dieciséis  $\mu\text{m}$  (Wilsher *et al.*, 2019). Se han reportado gestaciones aún después de puncionar le CE con agujas calibre veinticinco (Ferris *et al.*, 2016). Por otro lado; cuando se trabaja con embriones de burra, estos generalmente son vitrificados en una etapa de desarrollo en la cual son  $\leq 300 \mu\text{m}$ , y por ende no se requiere ni la punción ni la reducción de tamaño (Panzani *et al.*, 2012b; Pérez-Marín *et al.*, 2018; Bottrel *et al.*, 2019). El sistema de micro manipulación Piezo drill ha sido descrito en un estudio donde se emplearon embriones fenotipo burro grandes  $>300 \mu\text{m}$  (Ottmann *et al.*, 2018), y este sistema por lo general emplea micro-pipetas con una punta de entre 7-15  $\mu\text{m}$  (Choi *et al.*, 2011; Hinrichs & Choi, 2012; Hiraoka & Kitamura, 2015). Sin embargo, en el estudio hecho por Ottman y sus colaboradores, los embriones no fueron transferidos al útero de hembras después de ser calentados y solo la sobrevivencia in vitro fue reportada (Ottmann *et al.*, 2018). Un estudio reciente ha reporto la punción de blastocitos equinos con aguja (punta  $< 1\mu\text{m}$ ) ultra fina (Wilsher *et al.*, 2021).

### **Soluciones criopreservadoras empleadas para vitrificar embriones equinos**

La mayoría de los protocolos empleados para vitrificar embriones caballo utilizan una mezcla de criopreservadores penetrantes tales como el dimetil sulfoxido (DMSO), etilen glicol y glicerol. Otros protocolos incluyen la colocación del embrión en una mezcla de criopreservadores penetrantes tales como el etilen glicol, o etilen glicol y DMSO; los cuales son mezclados con criopreservadores no penetrantes tales como la galactosa o la sucrosa. Por ejemplo, el embrión es puesto en una primera solución que contiene una baja concentración de glicerol, y después es removido de esta última solución y puesto de manera sucesiva en soluciones que contienen concentraciones mayores de glicerol y etilen glicol (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2017; Pérez-Marín *et al.*, 2018). Por otra parte, la vitrificación de embriones caballo con una solución que contiene etilen glicol y DMSO también ha sido descrita (Choi *et al.*, 2011; Sánchez *et al.*, 2017; Wilsher *et al.*, 2019). En estos últimos protocolos se empieza poniendo el embrión en una solución con una concentración baja de etilen glicol y DMSO. Posterior al paso inicial, el embrión es colocado de manera secuencial en soluciones con una concentración mayor de los criopreservadores. Otras soluciones criopreservadoras utilizadas para vitrificar embriones caballo contienen una baja concentración de etilen glicol (solución inicial), y posterior a esto usan otra solución final denominada solución vitrificante. La solución final es compuesta de galactosa y es adicionada con altas concentraciones de etilen glicol (Choi *et al.*, 2011; Guignot *et al.*, 2015; Ferris *et al.*, 2016; Guignot *et al.*, 2016). Para la vitrificación de embriones fenotipo burro, un protocolo ha sido adaptado a partir de los estudios iniciales hechos para vitrificar embriones fenotipo caballo por parte de Eldridge-Panuska *et al.* (2005); este protocolo consiste típicamente de tres etapas o pasos, con una solución específica para cada paso. Por ejemplo, la solución uno contiene solamente glicerol; la solución dos tiene una mezcla de glicerol y etilen glicol;





y la solución tres contiene concentraciones mayores tanto de glicerol como de etilen glicol (Panzani *et al.*, 2012b; Panzani *et al.*, 2016; Pérez-Marín *et al.*, 2018). Otros estudios donde se vitrificaron embriones fenotipo burro fueron diseñados al tomar en cuenta la investigación hecha por Campos-Chillon *et al.* (2009). Estos utilizaron soluciones que contenían etilen glicol, y etilen glicol complementado con galactosa (Ottmann *et al.*, 2018; Pérez-Marín *et al.*, 2018). Otros han usado una solución inicial que contiene una mezcla de etilen glicol y DMSO; después de usar esta última, una segunda solución que contiene etilen glicol, DMSO, y sucrosa es empleada (Bottrel *et al.*, 2019; Bottrel *et al.*, 2020a; Bottrel *et al.*, 2020b).

### **Porta embriones y volúmenes de carga empleados durante el proceso de vitrificación**

Popotes no irradiados de cloruro de polivinilo con capacidad de cero punto veinticinco mililitros (mL) fueron uno de los primeros porta embriones descritos en especies equinas y han sido usados de manera frecuente a partir de entonces (Oberstein *et al.*, 2001; Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Hudson *et al.*, 2006; Hendriks & Stout, 2010; Choi *et al.*, 2011; Hendriks *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2017). Opuesto a los popotes de polivinilo los cuales emplean un volumen grande de solución durante el paso final de vitrificación; el sistema cryolock permitió a los investigadores vitrificar embriones fenotipo caballo en un volumen líquido pequeño (Díaz *et al.*, 2016; Ferris *et al.*, 2016; Wilsher *et al.*, 2019). La vitrificación de embriones equinos usando volúmenes líquidos pequeños es conseguida con porta embriones tales como el open pulled straw (Oberstein *et al.*, 2001; Moussa *et al.*, 2005; Guignot *et al.*, 2015; Guignot *et al.*, 2016), el fibreplug (Pérez-Marín *et al.*, 2018), el cryoloop (Oberstein *et al.*, 2001), la punta de micro-pipeta de micro carga de diámetro fino o fine diameter microloader pipette tip (Choi *et al.*, 2011), el cryoleaf (Scherzer *et al.*, 2011), el hemi straw (Sánchez *et al.*, 2017) y el stripper tip (Sánchez *et al.*, 2017).

Los embriones fenotipo caballo pueden ser vitrificados utilizando diferentes volúmenes de soluciones líquidas. Los volúmenes usados para cargar el embrión en el porta embriones varían desde cincuenta (Oberstein *et al.*, 2001) a treinta uL (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Hudson *et al.*, 2006; Hendriks & Stout, 2010; Choi *et al.*, 2011; Hendriks *et al.*, 2015). Volúmenes de carga cercanos a los tres o dos uL han sido reportados (Moussa *et al.*, 2005; Guignot *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2017; Pérez-Marín *et al.*, 2018; Wilsher *et al.*, 2019). Volúmenes para cargar embriones cercanos o menores a un uL son descritos también (Oberstein *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2017).

Cuando se trabaja con embriones fenotipo burro, el popote de cloruro de polivinilo no irradiado con capacidad de cero punto veinticinco mL ha sido reportado como porta embrión (Panzani *et al.*, 2012b; Fanelli *et al.*, 2020). Distintos porta embriones con capacidad de volumen pequeño han sido descritos de manera reciente para la vitrificación de embriones fenotipo burro; estos incluyen el cryotop (Bottrel *et al.*, 2019; Bottrel *et al.*, 2020a; Bottrel *et al.*, 2020b), el open pulled straw (Ottmann *et al.*, 2018)



y el fibreplug (Pérez-Marín *et al.*, 2018). Un volumen de solución líquida de treinta uL ha sido usado para vitrificar embriones fenotipo burro (Panzani *et al.*, 2012b); pero porta embriones de bajo volumen de carga, empleando volúmenes que van de tres a menos de un uL han sido utilizados también (Pérez-Marín *et al.*, 2018; Bottrel *et al.*, 2019; Bottrel *et al.*, 2020a; Bottrel *et al.*, 2020b).

### **Soluciones líquidas usadas para calendar embriones**

Con poca variación entre protocolos, el medio líquido usado para calendar embriones caballo usualmente contiene una concentración igual o menor a cero punto tres molar de sucrosa. Los embriones caballo son calentados y mantenidos por alrededor de un minuto en el medio líquido anteriormente mencionado. Después de lo anterior, los embriones son puestos en un segundo medio; este último tiene una concentración cercana o menor a cero punto quince molar de sucrosa; finalmente, el embrión es puesto en un medio líquido el cual no contiene sucrosa durante el paso final del proceso de calentamiento (Choi *et al.*, 2011; Guignot *et al.*, 2015; Ferris *et al.*, 2016; Guignot *et al.*, 2016; Wilsher *et al.*, 2019). Un protocolo de calentamiento de un solo paso fue reportado por Eldridge-Panuska *et al.* (2005) en este se utilizaba una solución de galactosa de cero punto cinco molar. El protocolo de calentamiento de un solo paso ha sido implementado también en otros estudios (Choi *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2017). Algunos investigadores calientan el embrión equino usando un protocolo de tres pasos; en el primer paso, el embrión es colocado en una solución uno molar de galactosa; en el segundo paso, el embrión permanece en una solución cero punto cinco molar de galactosa; y durante el tercer paso, el embrión es colocado en una solución líquida de cero punto veinticinco molar de galactosa (Campos-Chillon *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2011).

Así como se ha descrito para embriones fenotipo caballo (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005), el calentamiento de embriones fenotipo burro se lleva a cabo con un medio o solución de cero punto cinco molar de galactosa en lo que se denomina protocolo de calentamiento directo de un solo paso (Panzani *et al.*, 2012b; Panzani *et al.*, 2016). Otros protocolos emplean una solución de calentamiento de cero punto veinticinco molar de galactosa (Pérez-Marín *et al.*, 2018). En algunos protocolos de calentamiento, el embrión fenotipo burro es colocado de manera secuencial en soluciones líquidas las cuales tienen concentraciones decrecientes de sucrosa (Ottmann *et al.*, 2018; Pérez-Marín *et al.*, 2018; Bottrel *et al.*, 2019; Bottrel *et al.*, 2020a). Un estudio reciente ha comparado la calidad post vitrificación (calentados) de los embriones fenotipo burro cuando se emplea ya sea el protocolo de tres pasos con diluciones de sucrosa o cuando se usa el protocolo de un solo paso con solución de sucrosa (Bottrel *et al.*, 2020b).

### **Medios líquidos utilizados para la transferencia intrauterina de embriones equinos**

Algunos componentes de las soluciones líquidas usadas para transferir embriones equinos fueron descritos por primera vez durante la década de los setenta por Oguri



& Tsutsumi (1974). En este estudio, se reportaron dos soluciones de transferencia diferentes: una solución salina que contenía dos por ciento de polvo de gelatina y una solución de lactato de Ringer suplementada con suero de yegua y antibióticos. Hay dos técnicas de transferencia embrionaria post calentamiento reportadas por Eldridge-Panuska *et al.* (2005). La primera emplea PBS mas diez por ciento de FCS como un medio de transferencia, una vez que se remueve el embrión de la solución con galactosa que se empleó durante el calentamiento. La segunda es una técnica de transferencia directa post calentamiento. Esta última técnica consiste en mezclar la solución vitrificante que contiene el embrión (treinta micro litros de tres punto cuatro molar de glicerol y cuatro punto seis molar de etilen glicol) con dos columnas de líquido (de cero punto cinco molar de galactosa en PBS) de noventa micro litros cada una (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005). En la técnica anterior, tanto la solución vitrificante como la de calentamiento son mezcladas en la pajilla o popote durante el proceso de calentamiento, formando una solución diluida que contiene el embrión el cual es posteriormente transferida al útero de la yegua (Hudson *et al.*, 2006). El medio de mantenimiento Syngro<sup>®</sup> ha sido reportado como una solución de transferencia para embriones también (Barfield *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2017). Investigadores franceses experimentaron con un medio de cultivo sintético modificado de fluido de oviducto y lo usaron como un medio de transferencia para embriones (Guignot *et al.*, 2015).

La solución de mantenimiento EmCare<sup>®</sup> ha sido empleada para transferir embriones fenotipo burro por investigadores italianos y españoles (Panzani *et al.*, 2006; Panzani *et al.*, 2012a; Camillo *et al.*, 2010). Otros reportan como medios de transferencia ya sea el PBS o el lactato de Ringer (Camillo *et al.*, 2003; Camillo *et al.*, 2010). El medio de mantenimiento Vitrocell<sup>®</sup> con cero punto cuatro por ciento de BSA ha sido usado como medio de transferencia con embriones fenotipo burro por Peña-Alfaro *et al.* (2014). Un medio de mantenimiento isotónico (IMV technologies, L'Aigle, France) ha sido reportado como solución de transferencia para embriones burro también (Pérez-Marín *et al.*, 2018).

## DISCUSIÓN

En años recientes, la vitrificación embrionaria en especies equinas no convencionales se ha vuelto frecuente (Bottrel *et al.*, 2019; Bottrel *et al.*, 2020a; Bottrel *et al.*, 2020b; Fanelli *et al.*, 2020). Aun, la vitrificación, la transferencia embrionaria post vitrificación, y los índices de gestación son áreas que permanecen escasamente exploradas en embriones obtenidos a partir de burras (Ottmann *et al.*, 2018; Pérez-Marín *et al.*, 2018; Bottrel *et al.*, 2019) y no se ha hecho investigación con embriones de fenotipo mula, burdégano u otros híbridos equinos. Estudios iniciales en yeguas permitieron obtener conocimiento acerca del tiempo al cual el embrión descendía al útero, fue entonces descrito que el embrión entraba al útero tan temprano como a las 120 horas (cinco días) PO (Freeman *et al.*, 1991). La limitada disposición de burras y el número elevado que se ocupa para hacer investigación ha hecho difícil establecer de manera adecuada el tiempo de entrada por parte del embrión con fenotipo burro al útero de la burra. Es lógico pensar que el embrión con fenotipo burro desciende al útero de la



burra alrededor o pronto después del día sexto PO (Allen *et al.*, 1985; Vendramini *et al.*, 1997; Pérez-Marín *et al.*, 2017). Sin embargo, parece que en burras como ocurre en yeguas, la colección embrionaria es más exitosa si se practica más tarde en vez de más temprano en relación al día de ovulación. Además, el desarrollo temprano del embrión con fenotipo caballo parece ser más rápido cuando se compara con el embrión con fenotipo burro. Por ejemplo, cuando se colectan embriones al día séptimo o séptimo y medio PO, la mayoría de los embriones con fenotipo caballo son  $\geq 300 \mu\text{m}\varnothing$  (Hochi *et al.*, 1995; McCue *et al.*, 2010; Guignot *et al.*, 2015; Wilsher *et al.*, 2019), mientras que la mayoría de los embriones con fenotipo burro son  $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$  cuando se colectan durante los mismos días (Vendramini *et al.*, 1997; Panzani *et al.*, 2012b; Bottrel *et al.*, 2017; Pérez-Marín *et al.*, 2017; Pérez-Marín *et al.*, 2018; Dorado *et al.*, 2020).

Los embriones de las especies equinas desarrollan una cápsula glico-proteica (Stout *et al.*, 2005) que cuando está más formada tiene una baja permeabilidad a los criopreservadores (Kingma *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2012). Estos cambios en la permeabilidad de la CE pueden ser asumidos también de manera indirecta al analizar los estudios de vitrificación de embriones equinos  $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$  donde se reportan los ISEPVIG (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005; Hudson *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2011). Es probable que el alto ISEPVIG obtenido cuando se vitrifican embriones pequeños sea consecuencia de la naturaleza de estos embriones; los cuales tienen una cápsula menos desarrollada y son más permeables a los criopreservadores, por lo tanto, estos últimos pueden vitrificarse de manera fácil y obtener con ellos unos ISEPVIGs normales o altos. Por otro lado, los embriones con fenotipo caballo grandes  $>300 \mu\text{m}\varnothing$  tienen una cápsula con una permeabilidad menor a los criopreservadores. Estos cambios en la permeabilidad de la CE puede ser corroborada cuando se analizan los datos obtenidos por Legrand *et al.* (2001). En el estudio previo se observó que los embriones equinos que contaban con una cápsula más gruesa o desarrollada, la entrada al embrión por parte de los criopreservadores tales como el glicerol era limitada (Legrand *et al.*, 2001). Entonces, dependiendo de las subcategorías con respecto al tamaño de embrión solo la punción (Wilsher *et al.*, 2021) o la punción y la aspiración del líquido blastocélico serán necesarias para obtener un alto ISEPVIG (Díaz *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2017). La pregunta acerca de cuáles subcategorías de embriones con fenotipo burro (en términos de tamaño:  $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$ ,  $> 300 \leq 500 \mu\text{m}\varnothing$ ,  $> 500 \leq 1200 \mu\text{m}\varnothing$ ) requieren su cápsula puncionada y su líquido blastocélico aspirado antes de la etapa de vitrificación no ha sido investigada de manera completa todavía. Basado en estudios en caballos, y en limitados estudios en asnos (mirar sección previa de esta revisión); se puede inferir que los embriones de fenotipo burro requieren no solo de ser puncionados y su líquido blastocélico aspirado, pero también vitrificados, posteriormente calentados, y transferidos al útero de burras para calcular su ISEPVIG (Análisis de revisión hecho por Urías-Castro & Boeta, 2020).

En las especies equinas, los constituyentes de las soluciones líquidas para colectar embriones (SLPCE) fueron descritas por los estudios iniciales de Oguri (Oguri &



Tsutsumi, 1974). Estos eran medios isotónicos conteniendo suero de origen animal, y en algunos casos eran suplementados con glucosa, piruvato, y antibióticos. Algunas SLPCE contienen carbohidratos y antibióticos; la decisión acerca de agregar estos últimos será tomada basado en distintos factores tales como la cantidad de tiempo que se empleara manipulando o manteniendo el embrión y si las instalaciones y el equipo usado son limpios o estériles. Al analizar los estudios que reportan el uso de distintos SLPCEs, es aparente que en yeguas (Guignot *et al.*, 2015; Sánchez *et al.*, 2017; Wilsher *et al.*, 2019) y burras (Pérez-Marín *et al.*, 2018; Bottrel *et al.*, 2019) soluciones líquidas simples como el lactado de Ringer o la solución de Harman podrían ser buenas alternativas (lo cual tiene relevancia económica y práctica; ya que tanto el lactado de Ringer como la solución de Harman son por lo general más baratas y fáciles de obtener).

Existen muchas soluciones líquidas que pueden utilizarse para mantener embriones equinos. Algunos investigadores han empleado solución salina o lactado de Ringer. Existen soluciones más complejas tales como la Vigro<sup>®</sup> y la Syngro<sup>®</sup>, mientras que las más completas en términos de los requerimientos de nutrición embrionaria parecen ser la Ham's F10 y la TCM-199. Sin embargo, pocos estudios han comparado los diferentes tipos de soluciones de mantenimiento y los efectos de emplear cada una de ellas sobre la sobrevivencia embrionaria, desarrollo, y/o porcentajes de gestación (Oguri & Tsutsumi, 1974; Alvarenga *et al.*, 1993). El tipo de solución seleccionada dependerá de las circunstancias que prevalezcan durante los procesos de colección y mantenimiento, y de si el embrión será refrigerado, almacenado por horas, o procesado (transferido al útero) inmediatamente después de ser manipulado. Las soluciones líquidas utilizadas para lavar el embrión equino guardan una estrecha relación con las soluciones utilizadas como soluciones de mantenimiento. Sin embargo, cuando los medios de mantenimiento son usados como soluciones para lavar embriones a estas últimas soluciones usualmente se les agregan antibióticos.

La relación entre el diámetro de la punta de la micro-pipeta empleada para puncionar la CE y el efecto de esta sobre el ISEPVIg es un área que no ha sido investigada de manera completa en especies equinas, especialmente usando embriones con fenotipo burro o con fenotipo mula. Existe una variación dramática en el diámetro de la punta de la micro-pipeta usada para puncionar embriones grandes de equinos ( $> 300 \mu\text{m}\varnothing$ ) (Choi *et al.*, 2011; Guignot *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2016; Ferris *et al.*, 2016; Sánchez *et al.*, 2017; Wilsher *et al.*, 2019; Wilsher *et al.*, 2021).

Existen múltiples protocolos para vitrificar embriones equinos; sin embargo, los datos son limitados cuando se compara el ISEPVIg obtenido cuando se emplean cada uno de ellos (Choi *et al.*, 2010; Pérez-Marín *et al.*, 2018). Será interesante investigar más a fondo diferentes categorías en términos de tamaño embrionario ( $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$ ,  $> 300 \leq 500 \mu\text{m}\varnothing$ ,  $> 500 \leq 1200 \mu\text{m}\varnothing$ ) y la susceptibilidad de cada grupo a un protocolo de vitrificación específico. La vulnerabilidad del embrión a un solo criopreservador como el glicerol (Scott *et al.*, 2012), o a diferentes combinaciones: etilen glicol y glicerol (Kingma *et al.*, 2011); etilen glicol y DMSO – etilen glicol y galactosa (Campos-Chillon



*et al.*, 2009), es un área en la que se espera una investigación más a fondo usando asnos, mulas, burros y otros embriones híbridos. La permeabilidad embrionaria y la sobrevivencia embrionaria post vitrificación es un tema que ha sido parcialmente descrito antes, tanto para embriones producidos en vivo (Kingma *et al.*, 2011; Scott *et al.*, 2012) como para embriones fenotipo caballo producidos en vitro (Campos-Chillon *et al.*, 2009).

En términos generales, cuando el embrión es reducido de tamaño (ya sea porque es pequeño al momento de ser colectado; o porque es reducido de tamaño mediante la punción de la CE y aspiración del líquido blastocélico) y cuando se utiliza un volumen pequeño de solución líquida con el (menos de un micro litro) durante la etapa de vitrificación la probabilidad de la formación de hielo es disminuida ya que un alto TTI es inducido al sumergir el embrión de manera directa con el nitrógeno líquido (Analizado previamente por Urías-Castro & Boeta, 2020). Interesantemente, en los reportes iniciales que describen la vitrificación exitosa de embriones equinos pequeños los cuales resultaron en índices normales o altos de gestación, se utilizaron porta embriones con volúmenes grandes de carga, en estos casos los embriones eran criopreservados usando un volumen de treinta micro litros de solución vitrificante (Eldridge-Panuska *et al.*, 2005). Entre más pequeño es el embrión menor es el volumen de carga que el investigador puede usar durante el proceso de vitrificación. Sin embargo, la problemática está presente cuando el embrión es  $>300 \mu\text{m}\varnothing$ . Lo anterior es debido a que entre más grande es el embrión mayor es el volumen necesario para cargar el embrión en el porta embrión durante el proceso de vitrificación. La problemática mencionada previamente hace más difícil el alcanzar un alto ITT, lo que a su vez evita poder reducir la formación de hielo y puede también dar como resultado una disminución en el porcentaje de sobrevivencia embrionaria durante las etapas de vitrificación y calentamiento. La dificultad de lograr un alto ISEPVIG en embriones  $>300 \mu\text{m}\varnothing$  esta aun presente después de practicarles la punción de la CE y la aspiración del líquido blastocélico, especialmente con embriones  $>800 \mu\text{m}\varnothing$  los cuales son difíciles de cargar en el porta embriones usando un volumen pequeño de solución líquida para vitrificarlos (experiencia personal).

El proceso de calentamiento o desvitrificación embrionaria usualmente se inicia con soluciones líquidas de galactosa o sucrosa las cuales varían en su molaridad de cero punto dos a cero punto tres, cero punto cinco, o incluso concentraciones uno molar. Una vez calentado, el embrión es puesto de manera secuencial en soluciones con una molaridad cada vez menor de galactosa/sucrosa. En las etapas finales del proceso de calentamiento, el embrión es puesto en soluciones que no contienen galactosa/sucrosa. Otros protocolos emplean una técnica denominada transferencia directa post calentamiento, la cual consiste en colocar el embrión en una solución cero punto cinco molar de sucrosa (el uso de este último protocolo tiene implicaciones prácticas ya que permite la transferencia directa del embrión una vez que este fue calentado). En este último protocolo el embrión es calentado en la solución final y es transferido directamente al útero de la yegua. Pocos estudios han investigado la



relación entre el tamaño del embrión ( $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$  or  $>300 \mu\text{m}\varnothing$ ) y la susceptibilidad de cada uno de ellos a soluciones con molaridades específicas de sucrosa/galactosa (Choi *et al.*, 2011; Bottrel *et al.*, 2019; Bottrel *et al.*, 2020a; Bottrel *et al.*, 2020b). Por ejemplo, embriones grandes ( $>300 \mu\text{m}\varnothing$ ) podrían requerir más tiempo para alcanzar un equilibrio osmótico durante el proceso de calentamiento; debido lo anterior a la presencia de una capsula embrionaria más desarrollada la cual probablemente tenga menor permeabilidad. Es necesario investigar más a fondo las diferentes molaridades de las soluciones de calentamiento empleadas con embriones grandes de equinos. Ajustar las molaridades por subcategorías de tamaño embrionario ( $>600 \leq 900 \mu\text{m}\varnothing$ ;  $>900 \leq 1200$ ;  $>1200 \leq 1500 \mu\text{m}\varnothing$ ) podría mejorar los protocolos de calentamiento y el ISEPVIG. Un alto rango de variabilidad en la susceptibilidad embrionaria puede esperarse en base a las molaridades de las soluciones de calentamiento (basado en el grado de desarrollo y permeabilidad de la CE). No se ha establecido de manera clara si los embriones con fenotipo burro/caballo tienen diferentes susceptibilidades a los procesos de vitrificación y/o calentamiento (Bottrel *et al.*, 2020a; Bottrel *et al.*, 2020b). Por ejemplo, los embriones fenotipo burro parecen ser menos proclives al daño ocasionado por la vitrificación (Pérez-Marín *et al.*, 2018; Bottrel *et al.*, 2020a; Bottrel *et al.*, 2020b). La diferencia previa en términos de susceptibilidad entre embriones fenotipo caballo o fenotipo burro podría explicarse de manera parcial por diferencias en términos de permeabilidad hacia las sustancias criopreservadoras. Si la menor susceptibilidad que parecen presentar los embriones fenotipo burro a la vitrificación también se refleja en una menor susceptibilidad al calentamiento, es un tema que requiere más investigación.

Existen muchas alternativas de soluciones líquidas que pueden ser usadas para depositar intrauterinamente los embriones de équidos. La solución y el volumen para cargar y transferir el embrión dependerán del tamaño de este último. En general, una pipeta de inseminación puede ser usada si el embrión es grande ( $>300 \mu\text{m}\varnothing$ ). Una pajilla o popote de cero punto cinco o cero punto veinticinco mL pueden emplearse si el embrión es pequeño ( $\leq 300 \mu\text{m}\varnothing$ ). Soluciones líquidas simples como la salina fisiológica y/o lactato de Ringer (las cuales son baratas y fáciles de obtener) suplementadas con polvo de gelatina son alternativas que pueden usarse para transferir embriones de fenotipo caballo, burro, mula o burdégano. La PBS y los medios comerciales como el Syngro son otras opciones que pueden ser usadas como soluciones de transferencia embrionaria (sin embargo, son más difíciles de obtener y usualmente más caras). Otras alternativas pudieran proveer condiciones más estables para la nutrición y el desarrollo de los embriones equinos. Estas últimas pueden incluir los medios de cultivo suplementado con fluido sintético de oviducto o la PBS modificada de Dulbeccos. En asnos, las soluciones para transferencia embrionaria reportados de manera frecuente son el Emscare, la PBS, y la solución de mantenimiento Vitrocell®. No hay estudios que de manera metódica investiguen la relevancia del tipo de solución líquida utilizada para transferir embriones equinos sobre el impacto que pudieran tener sobre el ISEPVIG. No es sabido si soluciones simples



tales como la salina fisiológica o el lactato de Ringer son buenas alternativas como medios de transferencia embrionaria. No se ha investigado si el uso de solución salina o de lactato de Ringer por si solos o combinados con antibióticos resultan en ISEPVIG aceptables cuando se trabaja con embriones fenotipo burro o mula. Comparar el ISEPVIG obtenido cuando se transfieren embriones equinos usando soluciones líquidas simples y fáciles de obtener tales como la salina fisiológica o el lactato de Ringer; o más complejas tales como los medios de cultivo suplementado con suero de origen animal y/o fluido sintético de oviducto requiere más investigación. La investigación en el área de criopreservación utilizando embriones de fenotipo burro o embriones híbridos tales como mulas y burdéganos son modelos que pueden ayudar a desarrollar alternativas que resulten en una mejora de la sobrevivencia post vitrificación (calentamiento), resultando en un alto porcentaje de gestaciones post transferencia. Mas investigación es necesaria en yeguas y burras para mejorar los protocolos de vitrificación y por ende incrementar el ISEPVIG especialmente con embriones fenotipo burro y mula >300 µmØ.

#### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

#### **Agradecimientos**

Los autores quieren agradecer la ayuda financiera recibida a través del Proyecto: PROFAPI2015/287 que hizo posible la publicación de este artículo.

### **LITERATURA CITADA**

- ALLEN WR, Kydd J, Boyle MS, Antczak DF. 1985. Between-species transfer of horse and donkey embryos: A valuable research tool. *Equine Veterinary Journal*. 17(S3):53-62. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1985.tb04594.x>
- ALVARENGA MA, Alvarenga FC, Meira C. 1993. Modifications in the technique used to recover equine embryos. *Equine Veterinary Journal*. 25(S15):111-112. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb04841.x>
- BARFIELD JP, Sanchez R, Squires EL, Seidel GE. 2008. 60 Vitrification and conventional cryopreservation of equine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 21(1):130-130. <https://doi.org/10.1071/RDv21n1Ab60>
- BARFIELD JP, McCue PM, Squires EL, Seidel Jr GE. 2009. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos. *Cryobiology*. 59(1):36-41. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.04.003>
- BATTUT I, Colchen S, Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF. 1997. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine Veterinary Journal*. 29(S25):60-62. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb05102.x>
- BETTERIDGE KJ, Eaglesome MD, Mitchell D, Flood PF, Beriault R. 1982. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. *Journal of Anatomy*. 135(Pt1):191-209. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1168142/>





- BOTTREL M, Fortes T, Ortiz I, Hidalgo M, Dorado J. 2017. Short communication: Establishment and maintenance of donkey-in-mule pregnancy after embryo transfer in a non-cycling mule treated with oestradiol benzoate and long-acting progesterone. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 15(4):1-4.  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6326854>
- BOTTREL M, Ortiz I, Pereira B, Díaz-Jiménez M, Hidalgo M, Consuegra C, Morató R, Mogas T, Dorado J. 2019. Cryopreservation of donkey embryos by the cryotop method: Effect of developmental stage, embryo quality, diameter and age of embryos. *Theriogenology*. 125:242-248.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.11.011>
- BOTTREL M, Mogas T, Pereira B, Ortiz I, Díaz-Jiménez M, Consuegra C, Hidalgo M, Morató R, Dorado J. 2020a. The cryoprotective effect of Ficoll 70 on the post-warming survival and quality of Cryotop-vitrified donkey embryos. *Theriogenology*. 148:180-185. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.013>
- BOTTREL M, Hidalgo M, Mogas T, Pereira B, Ortiz I, Díaz-Jiménez M, Consuegra C, Morató R, Dorado J. 2020b. One-step warming does not affect the in vitro viability and cryosurvival of cryotop-vitrified donkey embryos. *Theriogenology*. 152:47-52.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.026>
- CAMILLO F, Vannozzi I, Rota A, Di Luzio B, Romagnoli S, Aria G, Allen WR. 2003. Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. *Reproduction in domestic animals*. 38(5):380-385.  
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00444.x>
- CAMILLO F, Panzani D, Scollo C, Rota A, Crisci A, Vannozzi I, Balbo S. 2010. Embryo recovery rate and recipients' pregnancy rate after nonsurgical embryo transfer in donkeys. *Theriogenology*. 73(7):959-965.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.024>
- CAMPOS-CHILLON LF, Suh TK, Barcelo-Fimbres M, Seidel Jr GE, Carnevale EM. 2009. Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. *Theriogenology*. 71(2):349-354. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.001>
- CARNEVALE EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM. 2000. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*. 54(6):965-979. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00405-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00405-2)
- CHOI YH, Gustafson-Seabury A, Velez IC, Hartman DL, Bliss S, Riera FL, Roldán JE, Chowdhary B, Hinrichs K. 2010. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction*. 140(6):893-902. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0141>
- CHOI YH, Velez IC, Riera FL, Roldán JE, Hartman DL, Bliss SB, Blanchard TL, Hayden SS, Hinrichs K. 2011. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology*. 76(1):143-152.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.028>
- DERBALA MK, Abdou MS. 2017. Transfer of Large Equine Embryos in Arabian Mares. *ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 3(4):19-24.  
<http://dx.doi.org/10.20431/2455-2518.0304003>
- DIAZ F, Bondioli K, Paccamonti D, Gentry GT. 2016. Cryopreservation of Day 8 equine embryos after blastocyst micromanipulation and vitrification. *Theriogenology*. 85(5):894-903. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.10.039>



- DORADO J, Bottrel M, Ortiz I, Díaz-Jiménez M, Pereira B, Consuegra C, Carrasco JJ, Gómez-Arrones V, Domingo A, Hidalgo M. 2020. Factors Affecting Embryo Recovery Rate, Quality, and Diameter in Andalusian Donkey Jennies. *Animals*. 10(11):1967. <https://doi.org/10.3390/ani10111967>
- ELDRIDGE-PANUSKA WD, di Brienza VC, Seidel Jr GE, Squires EL, Carnevale EM. 2005. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*. 63(5):1308-1319. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.06.015>
- FANELLI D, Panzani D, Rota A, Tesi M, Camillo F, Bollwein H, Herrera C. 2020. Cryopreservation of donkey embryos: Comparison of embryo survival rate after in vitro culture between conventional freezing and vitrification. *Theriogenology*. 154:11-16. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.020>
- FERRIS RA, McCue PM, Trundell DA, Morrissey JK, Barfield JP. 2016. Vitrification of large equine embryos following manual or micromanipulator-assisted blastocoele collapse. *Journal of Equine Veterinary Science*. 100(41):64-65. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.047>
- FREEMAN DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL. 1991. Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology*. 36(5):823-830. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90348-H](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90348-H)
- GUIGNOT F, Reigner F, Perreau C, Tartarin P, Babilliot JM, Bed'hom B, Vidament M, Mermillod P, Duchamp G. 2015. Preimplantation genetic diagnosis in Welsh pony embryos after biopsy and cryopreservation. *Journal of Animal Science*. 93(11):5222-5231. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9469>
- GUIGNOT F, Blard T, Barrière P, Gasgogne T, Gaude Y, Yvon JM, Mermillod P, Reigner F. 2016. Easy, quick and cheap technique to cryopreserve Welsh B pony blastocyst. *Journal of Equine Veterinary Science*. 100(41):53. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.022>
- HENDRIKS WK, Stout TAE. 2010. Slow freezing is less damaging to equine embryos than is vitrification. *Animal Reproduction Science*. 121:279-280. [https://www.researchgate.net/publication/48327277\\_Slow-freezing\\_is\\_less\\_damaging\\_to\\_equine\\_embryos\\_than\\_is\\_vitrification](https://www.researchgate.net/publication/48327277_Slow-freezing_is_less_damaging_to_equine_embryos_than_is_vitrification)
- HENDRIKS WK, Roelen BAJ, Colenbrander B, Stout TAE. 2015. Cellular damage suffered by equine embryos after exposure to cryoprotectants or cryopreservation by slow-freezing or vitrification. *Equine veterinary journal*. 47(6):701-707. <https://doi.org/10.1111/evj.12341>
- HERRERA C. 2021. Vitrification of Equine In Vivo-Derived Embryos After Blastocoele Aspiration. In: Wolkers W.F., Oldenhof H. (eds) Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 2180. Humana, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_25)
- HINRICHS K. 1990. Work in progress: A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. *Theriogenology*. 33(5):937-942. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(90\)90056-Y](https://doi.org/10.1016/0093-691X(90)90056-Y)
- HINRICHS K, Choi YH. 2012. Equine embryo biopsy, genetic testing, and cryopreservation. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32(7):390-396. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.005>
- HIRAOKA K, Kitamura S. 2015. Clinical efficiency of Piezo-ICSI using micropipettes with a wall thickness of 0.625 µm. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 32(12):1827-1833. <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs10815-015-0597-9>



- HOCHI S, Fujimoto T, Oguri N. 1995. Large equine blastocysts are damaged by vitrification procedures. *Reproduction, fertility and development*. 7(1):113-117. <https://doi.org/10.1071/RD9950113>
- HUDSON J, McCue PM, Carnevale EM, Welch S, Squires EL. 2006. The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer. *Journal of Equine Veterinary Science*. 26(2):51-54. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2005.11.012>
- IULIANO MF, Squires EL, Cook VM. 1985. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *Journal of Animal Science*. 60(1):258-263. <https://doi.org/10.2527/jas1985.601258x>
- KINGMA SG, Thibault ME, Betteridge KJ, Schlaf M, Gartley CJ, Chenier TS. 2011. Permeability of the equine embryonic capsule to ethylene glycol and glycerol in vitro. *Theriogenology*. 76(8):1540-1551. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.026>
- LANDIM E ALVARENGA FC, Alvarenga MA, Meira C. 1993. Transmission electron microscopy of equine embryos cryopreserved by different methods. *Equine Veterinary Journal*. 25(S15):67-70. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb04830.x>
- LEGRAND E, Krawiecki JM, Tainturier D, Corniere P, Delajarraud H, Bruyas JF. 2001. Does the embryonic capsule impede the freezing of equine embryos? EQUINE EMBRYO TRANSFER. 62. <http://www.havemeyerfoundation.org/images/monograph3.pdf#page=73>
- MACLELLAN LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, McCue PM, Seidel Jr GE, Squires EL. 2002. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin. *Theriogenology*. 58(2-4):717-720. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00766-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00766-5)
- MCCUE PM, Ferris RA, Lindholm AR, DeLuca CA. 2010. Embryo recovery procedures and collection success: results of 492 embryo-flush attempts. *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners*. December (56):318-321. <https://aaep.org/sites/default/files/issues/proceedings-10proceedings-z9100110000318.pdf>
- MCKINNON AO, Squires EL. 1988. Equine embryo transfer. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*. 4(2):305-333. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30643-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30643-0)
- MEADOWS S, Lisa H, Welsh C. 2000. Factors affecting embryo recovery, embryo development and pregnancy rate in a commercial embryo transfer programme. *Proceedings of the 1st European Equine Gamete Group, Havemeyer Foundation Monograph Series*. 1:61-2. <http://www.havemeyerfoundation.org/images/monograph1.pdf#page=72>
- MOUSSA M, Bersinger I, Doligez P, Guignot F, Duchamp G, Vidament M, Mermillod P, Bruyas JF. 2005. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*. 64(7):1619-1632. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.001>
- OBERSTEIN N, O'donovan MK, Bruemmer JE, Seidel Jr GE, Carnevale EM, Squires EL. 2001. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*. 55(2):607-613. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00429-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00429-0)



- OGURI N, Tsutsumi Y. 1974. Non-surgical egg transfer in mares. *Reproduction*. 41(2): 313-320. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0410313>
- OTTMANN L, Reigner F, Allamellou JM, Magistrini M, Guignot F. 2018. Preimplantation Genetic Diagnosis in Donkey Embryos After Biopsy. *Journal of Equine Veterinary Science*. 66:195. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.05.085>
- PANZANI D, Rota A, Vannozi I, Kindahl H, Govoni N, Camillo F. 2006. Cervical catheterization is not responsible for the low pregnancy rate following transcervical embryo transfer in donkeys. *Animal Reproduction Science*. 94(1-4):370-373. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.04.030>
- PANZANI D, Rota A, Crisci A, Kindahl H, Govoni N, Camillo F. 2012a. Embryo quality and transcervical technique are not the limiting factors in donkey embryo transfer outcome. *Theriogenology*. 77(3):563-569. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.032>
- PANZANI D, Rota A, Romano C, Pratelli G, Sabatini C, Camillo F. 2012b. Birth of the first donkey foals after transfer of vitrified embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32(7):419. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.05.047>
- PANZANI D, Vannozi I, Bocci C, Rota A, Tesi M, Camillo F. 2016. In vitro evaluation by DAPI staining of fresh, cooled and vitrified donkey embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*. 41:71-71. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.061>
- PEÑA-ALFARO CE, Barros LO, Carneiro GF, Gastal MO, Gastal EL. 2014. Embryo transfer in Pega donkeys (*Equus asinus*) in Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science*. 34(1):185. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.10.135>
- PÉREZ-MARÍN CC, Vizuite G, Galisteo JJ. 2017. Embryo recovery results in Hispano-Arabe horse and Spanish donkey breeds. *Livestock Science*. 206:76-81. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.10.011>
- PÉREZ-MARÍN CC, Vizuite G, Vazquez-Martinez R, Galisteo JJ. 2018. Comparison of different cryopreservation methods for horse and donkey embryos. *Equine Veterinary Journal*. 50(3):398-404. <https://doi.org/10.1111/evj.12777>
- ROSER JF, Etcharren MV, Miragaya MH, Mutto A, Colgin M, Losinno L, Ross PJ. 2020. Superovulation, embryo recovery, and pregnancy rates from seasonally anovulatory donor mares treated with recombinant equine FSH (reFSH). *Theriogenology*. 142:291-295. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.030>
- SÁNCHEZ R, Blanco M, Weiss J, Rosati I, Herrera C, Bollwein H, Burger D, Sieme H. 2017. Influence of embryonic size and manipulation on pregnancy rates of mares after transfer of cryopreserved equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*. 49:54-59. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.10.004>
- SCHERZER J, Davis C, Hurley DJ. 2011. Laser-assisted vitrification of large equine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*. 46(6):1104-1106. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01795.x>
- SCOTT BR, Carwell DB, Hill RA, Bondioli KR, Godke RA, Gentry GT. 2012. Evaluation of capsule permeability in the equine blastocyst. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32(12):795-798. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.03.010>
- SILVA PC, Oliveira JP, Dutra GA, Paiva SO, Caram DF, Junqueira RG, Jacob JC. 2018. Taxa de recuperação e características morfológicas de embriões muares (*Equus caballus* x *Equus asinus*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38(7):1453-1457. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4651>



- SQUIRES EL, García RH, Ginther OJ. 1985. Factors affecting success of equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*. 17(S3):92-95.  
<https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1985.tb04604.x>
- STOUT TAE, Meadows S, Allen WR. 2005. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. *Animal reproduction science*. 87(3-4):269-281.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.11.009>
- URÍAS-CASTRO C, Boeta AM. 2020. Post vitrification pregnancy rate of in vivo produced embryos derived from equids. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 11(4):1142-1149. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5437>
- VENDRAMINI OM, Bruyas JF, Fieni F, Battut I, Tainturier D. 1997. Embryo transfer in Poitou donkeys, preliminary results. *Theriogenology*. 47(1):409.  
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)82536-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)82536-8)
- WILSHER S, Rigali F, Couto G, Camargo S, Allen WR. 2019. Vitrification of equine expanded blastocysts following puncture with or without aspiration of the blastocoele fluid. *Equine Veterinary Journal*. 51(4):500-505. <https://doi.org/10.1111/evj.13039>
- WILSHER S, Rigali F, Kovacs S, Allen WR. 2021. Successful vitrification of manually punctured equine embryos. *Equine Veterinary Journal*, 53(6):1227-1233.  
<https://doi.org/10.1111/evj.13400>

#### [Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>