

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES OVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*
EN DIFERENTES ESTADIOS MEDIANTE DOS MÉTODOS DE
VITRIFICACIÓN**

Pedro CLAUDINO DOS SANTOS NETO

TESIS DE MAESTRÍA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2014**

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES OVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*
EN DIFERENTES ESTADIOS MEDIANTE DOS MÉTODOS DE
VITRIFICACIÓN**

Pedro CLAUDINO DOS SANTOS NETO

Alejo MENCHACA – Director de tesis

Martina CRISPO – Codirectora de tesis

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2014**

LISTA DE ABREVIATURAS

IA: inseminación artificial

PIV: producción *in vitro*

MIV: maduración *in vitro*

FIV: fertilización *in vitro*

CIV: cultivo *in vitro*

FSH: hormona folículo estimulante

LH: hormona luteinizante

DMSO: dimetilsulfóxido

EG: etilenglicol

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue un trabajo realizado en la Fundación IRAUy y en la Unidad de Animales Transgénicos y Experimentación (UATE), Institut Pasteur de Montevideo, donde el apoyo de todos los integrantes de ambos grupos fue fundamental para que se pudiese llevar a cabo dicha maestría. El apoyo financiero para la realización de los experimentos se obtuvo de un proyecto aprobado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), la cual también apoyó financieramente al personal técnico para el desarrollo de la tesis de maestría (PR_FSA_2009_1_1333).

Me gustaría expresar mi especial agradecimiento:

Al Dr. Alejo Menchaca, mi tutor y orientador durante el período de la maestría, por su apoyo y todas sus enseñanzas durante estos últimos años. Por haber aceptado el desafío de conducir la dirección de mi tesis además de integrarme al grupo y darme el aporte necesario para seguirme formando.

A la Dra. Martina Crispo, por la codirección de la tesis, por su colaboración con la Fundación IRAUy en estas líneas que vienen desarrollando en conjunto, además de toda su ayuda y apoyo en mi formación técnica y académica durante estos años.

A la Dra. Teresa de Castro y Andrea Pinczak, grandes compañeras de trabajo, espejo de profesionalismo, personas que siempre tienen algo bueno para enseñar y con quien siempre se puede contar.

A Marcela Vilariño, compañera de trabajo, amiga, por todo su enseñamiento técnico y personal con quien siempre pude contar y me alegro poder haber trabajado y convivido durante todo ese período.

A Richard Núñez, compañero de trabajo, amigo, por todas sus enseñanzas, voluntad, compañerismo y buena disposición, por los buenos momentos vividos que compartimos y que seguiremos compartiendo.

A los integrantes de Fundación IRAUy, amigos que se fueron uniendo y formando a lo largo de los años: Camila García-Pintos, Robert Wijma, Natalibeth Barrera, Fátima Rodríguez, Federico Cuadro por recibirme en el grupo y por querer acompañar mi trabajo y desarrollo el cual requirió mucho esfuerzo y dedicación. Gracias por la amistad y los buenos momentos ya vividos los que seguiremos compartiendo.

A la Unidad de Animales Transgénicos y Experimentación del Institut Pasteur de Montevideo y sus integrantes: Lucía, Geraldine, Paula, Ana Paula, Maria Noel, Gabriel, Pía, Sergio y Martín por su apoyo y colaboración para la elaboración de mi proyecto.

A todos los que han colaborado en el desarrollo de esta tesis, fundamentalmente a la Fundación IRAUy. A Jeremías en el manejo y cuidado de los animales, a Jose Piaggio por su colaboración con la estadística y por la buena disposición para compartir sus conocimientos, a la UATE por compartir el laboratorio para poder desarrollar los experimentos, a Robert Wijma y Fatima Rodríguez por su colaboración en los experimentos, a Rodolfo Ungerfeld por su colaboración y enseñanzas, además de abrirme las puertas de Uruguay en 2010. También quiero expresar mi agradecimiento a todo su grupo (Laboratorio de Fisiología), a Solana, Florencia, Lorena, Matias, Tatiana, Fernando “Poni”, Juan Pablo, Milton y a los que se sumaron en todos esos años por la buena onda que siempre mantuvieron.

A mis amigos de la vida: Ismael, Gustavo, Felipe, Edison, Angelo “Gigio”, Thiago “Xanxere”, Giba, Gustavo “K-dela”, Celso “Popito”, Leonardo Martins, Fabiano Cruz, André Dias “Lagarto”, Luis Henrique, Saul Gaudencio “Urso”, Eduardo Ribeiro “Dudi”, Ricardo Henrique “Tizil”, Paulo, Vagner, Kaio, Zago, João Ricardo “Bubi” entre tantos otros que se formaron y acumularon durante mi jornada personal y profesional, les quiero decir: Gracias, ustedes son fundamentales en mi vida.

A un lugarcito perdido en el mundo pero único “Special”: Campina Dona Ida, por enseñarme a valorar y tener respeto a los animales frutos de mi alegría y dedicación donde he vivido los momentos más felices que la vida pudo proporcionarme.

A mi familia, mi padre Pedro y mi madre Leila; mi hermana Tainá, mis abuelos, tíos, primos, demás parientes y agregados, por motivarme y por siempre ayudar en el fortalecimiento y desarrollo de mis sueños. Para mi es una alegría tener una familia espectacular, completa y feliz.

A todos mis amigos y personas que cercanas a mi vida, gracias por todo, son únicos.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	i
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Producción <i>in vitro</i> de embriones.....	4
2.2 Estadio embrionario al momento de la transferencia.....	7
2.3 Criopreservación de embriones.....	8
2.3.1 Congelación convencional o “lenta”.....	9
2.3.2 Vitricificación.....	11
3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	15
4. HIPOTESIS	16
5. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivo específico.....	16
6. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	17
6.1. Diseño experimental.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1. Producción <i>in vitro</i> de los embriones	18
7.1.1 Maduración <i>in vitro</i>	18
7.1.1.1 Obtención de los Complejos Cumulus Ovocito (CCO).....	18
7.1.1.2 Maduración <i>in vitro</i>	18
7.2.2 Fertilización <i>in vitro</i>	19
7.2.2.1 Selección espermática.....	19
7.2.2.2 Fertilización <i>in vitro</i>	19
7.2.3 Cultivo <i>in vitro</i>	20
7.3 Vitricificación de los embriones	20
7.3.1 Vitricificación con Cryotop.....	20
7.3.2 Vitricificación con Espátula.....	21
7.4 Tinción de los embriones –Coloración con Ioduro de Propidio	23
7.5 ANALISIS ESTADISTICO	23
8. RESULTADOS	24

9. DISCUSIÓN.....	28
10. CONCLUSIONES GENERALES.....	31
11. REFERENCIAS.....	32
12. PUBLICACIONES.....	42

1. RESUMEN

Diferentes protocolos de vitrificación han sido evaluados en los últimos años en embriones ovinos producidos *in vivo*, sin embargo, ninguno de ellos permite una gran sobrevivencia cuando se aplica a embriones producidos *in vitro*. El objetivo de esta tesis fue evaluar dos nuevos métodos de vitrificación (Cryotop y Espátula) nunca antes evaluados en ovinos para la criopreservación de embriones al Día 2 o al Día 6 luego de la fertilización *in vitro* (Día 0). Complejos cumulus ovocitos fueron madurados, fertilizados y cultivados *in vitro* hasta el Día 8. Al Día 2 los embriones fueron asignados al azar a 5 grupos experimentales de los cuales dos grupos fueron vitrificados en el Día 2 por el método Cryotop o Espátula; dos grupos fueron vitrificados en el Día 6 por el método Cryotop o Espátula; y un grupo no fue sometido a vitrificación permaneciendo los embriones en cultivo *in vitro* como grupo control. Luego de la vitrificación y el calentamiento los embriones continuaron su desarrollo *in vitro* junto con el grupo control hasta el Día 8. Se determinó la tasa de sobrevivencia a las 3 h y 24 h luego del calentamiento, la tasa de desarrollo al Día 6, la producción de blastocistos al Día 8, y la tasa de eclosión al Día 8 sobre el total de blastocistos en ese Día así como sobre el total de embriones clivados en el Día 2. Asimismo se determinó el número total de células presentes en blastocistos expandidos en el Día 7. Los resultados demostraron que la tasa de sobrevivencia a las 24 horas luego de la vitrificación-calentamiento y la producción de blastocistos en el Día 8 se vieron afectadas por el estadio del embrión, siendo menor para aquellos vitrificados en el Día 2 comparados con embriones vitrificados en el Día 6 ($P < 0,05$). Comparado con el grupo control sin vitrificar, los embriones vitrificados en el Día 2 presentaron una menor tasa de desarrollo en el Día 6 ($P < 0,05$), no encontrando un efecto del método de vitrificación utilizado (Cryotop o Espátula) ($P = NS$). La tasa de eclosión sobre el total de los blastocistos presentes al Día 8 no estuvo afectada por la vitrificación, siendo similar a los embriones no vitrificados ($P = NS$). A pesar de que los embriones en estadios tempranos mostraron menor criotolerancia, aquellos embriones que sobrevivieron el proceso de vitrificación-calentamiento tuvieron una alta capacidad de desarrollo y de eclosión, similar a la vitrificación en los estadios de mórula o blastocisto. El número total de células no mostró diferencias entre los grupos experimentales evaluados. El método de vitrificación no afectó ninguna de las variables evaluadas, sin embargo, sí se encontró un efecto del estadio embrionario al momento de

realizar la vitrificación. En conclusión, ambos métodos Cryotop y Espátula permiten una aceptable tasa de sobrevivencia y desarrollo en embriones ovinos producidos *in vitro* y vitrificados en el Día 2 o en el Día 6. La vitrificación mediante estos dos métodos de enfriamiento ultra-rápido y volumen mínimo representan una alternativa promisoría para embriones ovinos en diferentes estadios producidos por fertilización *in vitro*.

Palabras clave: embriones, fertilización *in vitro*, vitrificación, ovinos.

ABSTRACT

Different vitrification protocols have been evaluated in the last decades in ovine embryos produced *in vivo*, however, none of them allows high survival rates when applied to *in vitro* produced embryos. The aim of the experiment was to evaluate two vitrification methods (Cryotop and Spatula) used in our laboratory for cryopreservation of ovine embryos at Day 2 or Day 6 after *in vitro* fertilization (Day 0). Cumulus oocyte complexes were matured, fertilized and then cultured *in vitro* until Day 8. On Day 2 embryos were randomly assigned to 5 experimental groups: two groups vitrified on Day 2 by Cryotop or Spatula method, two groups vitrified on Day 6 by the same methods and one group of non-vitrified embryos that were maintained in *in vitro* culture as a control group. After vitrification and warming, embryos continued to develop *in vitro* along with the control group. We analyzed the survival rate of vitrified embryos at 3 h and 24 h after warming, the development rate at Day 6, the production of blastocysts at Day 8 and hatching rate on the overall blastocyst at Day 8 as well as on the total cleaved embryos at Day 2. Indeed, total number of cells in expanded blastocysts was determined at Day 7. The results showed that the survival rate 24 hours after warming and the production of blastocysts at Day 8 were affected by the stage of the embryo, being lower for those vitrified at Day 2 compared with embryos vitrified at Day 6. Moreover, embryos vitrified at Day 2 had lower development rate at Day 6 as compared to the non-vitrified control group; in spite no effect of the vitrification method was observed. The hatching rate of blastocysts at Day 8 was not affected by vitrification, being similar to non-vitrified control embryos (P=NS). Even though early stage embryos showed lower

cryotolerance, those embryos that survived the vitrification-warming process showed high development and hatching rates, similar to vitrified morulae or blastocysts. Likewise, no differences among all groups were found in total cell number on Day 7 expanded blastocysts. In general, vitrification methods did not affect any of the evaluated variables; however, there was an effect of the embryonic stage at the moment of vitrification. In conclusion, both methods (Cryotop and Spatula) allow acceptable survival and development rates in vitrified Day 2 and Day 6 ovine *in vitro* produced embryos. Vitrification using these ultra-rapid cooling rate and minimum volume methods represents a promising alternative for *in vitro* produced ovine embryos at different stages of development.

Keywords: embryos, *in vitro* fertilization, vitrification, ovine.

2. INTRODUCCIÓN

En términos generales la reproducción y su control juegan un rol importante en la producción animal, lo cual puede determinar el éxito o el fracaso de la actividad económica que se lleve adelante. Por este motivo las biotecnologías de la reproducción representan una herramienta para optimizar el potencial de multiplicación de los animales de producción como vacas, cabras y ovejas. Los principales avances en los últimos años han surgido del mayor conocimiento de los aspectos básicos de la fisiología ovárica y del desarrollo embrionario para generar tecnologías con aplicación en diferentes ámbitos. Comenzando con el control del ciclo estral y la inseminación artificial (IA) en la década de los 60' y 70' y continuando con los programas de múltiple ovulación y transferencia de embriones (MOET) en la década de los 80' y 90', la producción *in vitro* de embriones (PIV) representa la tercera generación de técnicas de reproducción asistida en los animales, la que se ha aplicado en ovejas recién en los últimos años (Cognié *et al.*, 2004). Esta técnica se divide en cuatro pasos principales: la colecta de ovocitos, su maduración *in vitro* (MIV), fertilización *in vitro* (FIV) y el cultivo *in vitro* (CIV) de los embriones hasta la etapa de blastocisto. En esta etapa los embriones pueden ser criopreservados o transferidos en el útero de hembras receptoras.

2.1. PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

La producción *in vitro* de embriones representa un importante avance en las biotecnologías reproductivas con proyección aplicable a diferentes áreas. Esta técnica se ha utilizado tanto para investigación en embriología básica, biología y fisiología del desarrollo, evaluación de la fertilidad espermática así como en programas de reproducción asistida tanto en animales como en humanos. Asimismo en los últimos años dicha técnica ha dado lugar a la puesta en práctica de biotecnologías más complejas como la clonación y más recientemente la transgénesis animal, con importantes avances tanto a nivel internacional como local (Damak *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 2001; Bacci *et al.*, 2007; Crispo *et al.*, 2014a). Por otra parte, estas tecnologías dan acceso a la investigación fundamental en gametos y embriones sobre aspectos tanto

vinculados al ciclo celular y la regulación de los genes, como a su expresión y funcionalidad, lo que puede aportar a la identificación de nuevos bancos para la selección asistida de marcadores genómicos con caracteres reproductivos. Asimismo la producción *in vitro* de embriones también es una herramienta importante para la conservación de especies en riesgo de extinción, debido a la posibilidad de utilizar gametos de animales vivos y muertos (Galli and Lazzari, 1996; Wani *et al.*, 2002). Con fines productivos, esta tecnología permite aumentar notoriamente la descendencia de animales de élite y de esta forma reducir el intervalo generacional (Gandolfi *et al.*, 1995; Wani *et al.*, 2002). En los pequeños rumiantes, la producción de embriones por métodos convencionales o *in vivo* requiere procedimientos quirúrgicos para la colecta de los embriones que a corto o largo plazo afectan la repetitividad en hembras donantes sometidas a los tratamientos de superestimulación. Por lo tanto, la producción *in vitro* en estas especies tiene algunas ventajas tales como la posibilidad de recoger ovocitos de las hembras hormonalmente estimuladas o no (Morton *et al.*, 2005), el uso de donantes pre-púberes (Morton *et al.*, 2008), seniles (Baldassarre *et al.*, 2007), preñadas o incluso *post-mortem*. Estudios sobre el proceso de fertilización *in vitro* en mamíferos se iniciaron en 1878 por el científico vienés Leopold Schenk, y el primer animal doméstico producido por fertilización *in vitro* fue un conejo casi un siglo más tarde en 1959 en EEUU (Chang *et al.*, 1959). Algunos años más tarde, Hanada *et al.*, (1985) reportaron en Japón el primer nacimiento en cabras después de la fertilización *in vitro* usando ovocitos madurados *in vivo*, y recién en 1993 se publicó por primera vez el nacimiento después de la transferencia de un embrión producido totalmente *in vitro* en esta especie (Crozet *et al.*, 1993). El primer cordero nacido por maduración y fertilización *in vitro* fue reportado en Nueva Zelanda también en la década de los 90' (Pugh *et al.*, 1991).

La mejora de la eficiencia en la producción *in vitro* de embriones en especies productivas es actualmente motivo de estudio, incluyendo los pequeños rumiantes. En bovinos, datos publicados por la *International Embryo Transfer Society* (IETS) muestran que el 44% de los embriones transferidos en 2012 fueron producidos por fertilización *in vitro* (Perry, 2013). Esta tecnología ha mostrado un fuerte crecimiento en algunos países de la región, donde por ejemplo en Brasil desde el año 2005, la fertilización *in vitro* cobra un importante rol dentro las técnicas de producción de embriones bovinos. Los reportes del año 2005 muestran que un 54,3% de los embriones producidos fueron mediante fertilización *in vitro* y el 45,6% *in vivo* (SBTE, 2009). En la actualidad, es el país que más embriones produce en el mundo y más del 85% (350.000) de los

embriones bovinos transferidos en 2012 se produjeron *in vitro* (Viana *et al.*, 2012). En ovejas y cabras, si bien no existe un relevamiento mundial sistemático y consistente de la producción de embriones *in vitro*, sabemos que esta tecnología se encuentra menos desarrollada y su adopción es mucho menor que en bovinos. En estas especies, la heterogeneidad de los ovocitos recolectados de los folículos en crecimiento por aspiración folicular guiada por laparoscopia “*Laparoscopic Ovum Pick Up*” (LOPU) o de los ovarios provenientes de las hembras luego de la faena en el frigorífico, sigue siendo un enorme desafío para el éxito de la maduración *in vitro* y también limita la capacidad de desarrollo del embrión. Además, la menor calidad de los embriones producidos *in vitro* en comparación con embriones producidos *in vivo* se traduce en baja sobrevivencia y una tasa de éxito aún lejos de lo deseado, lo que termina restringiendo el uso más amplio de esta tecnología (Rodríguez-Dorta *et al.*, 2007; Paramio *et al.*, 2010). Por lo tanto, se han reportado en varios estudios diversos intentos para determinar las condiciones más adecuadas para la maduración *in vitro*, fertilización y desarrollo con el fin de maximizar la tasa de producción de embriones y mejorar su calidad. Estos diferentes pasos se encuentran actualmente mejor establecidos en especies domésticas rumiantes (bovinos, ovinos, caprinos, bubalinos), y también ha habido cierto progreso en otras especies no rumiantes como la equina (Hinricks *et al.*, 2010) y porcina (Gil *et al.*, 2010). Si bien es una técnica extremadamente versátil y que ha sido estudiada intensamente durante los últimos 30 años, la variabilidad en la cantidad y la calidad de los ovocitos recogidos y la baja viabilidad luego de la criopreservación en aquellos embriones producidos *in vitro* aún limita esta tecnología y su uso a gran escala (Cognié *et al.*, 2003).

A diferencia de los bovinos, en ovinos existe menos información y son pocos los laboratorios a nivel mundial que trabajan con esta tecnología. Además, el uso por el sector productivo se ve limitado por una serie de aspectos técnicos o biológicos que no han sido aún superados. Una de las dificultades más destacables es la operativa al momento de transferir los embriones a las ovejas receptoras, porque éstos se transfieren a los 6 días luego de la fertilización con pocas posibilidades de criopreservación para ser transferidos posteriormente. Por este motivo es necesario contar con receptoras disponibles en forma permanente para sincronizarlas cada vez que se realiza una tanda de producción *in vitro*, en lugar de criopreservación, almacenarlos y luego poder transferirlos en un momento planificado. Probablemente estos motivos han limitado el uso de esta técnica a pocos laboratorios en el mundo y solo tiene un nivel de

investigación incipiente en algunos países de la región como Argentina y Brasil. En Uruguay los primeros antecedentes con esta tecnología son del año 1992 cuando se reportó la producción de 5 embriones de dos células por fecundación *in vitro* en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Facultad de Veterinaria, UdelaR (Larocca *et al.*, 1992), los que fueron transferidos a ovejas receptoras lamentablemente no logrando ninguna preñez. A partir de 2010 esta técnica ha sido puesta a punto por nuestro grupo en ovinos. En el año del 2011 se obtuvo el nacimiento de los primeros corderos producidos por fertilización *in vitro* en Uruguay (Menchaca *et al.*, 2012a), y posteriormente en 2012 con esta técnica se logró el nacimiento de los primeros corderos transgénicos nacidos de Sudamérica (Crispo *et al.*, 2014a). Aunque posea semejanzas con la técnica empleada en bovinos, en los ovinos hay menos información y pocos grupos de investigación que aporten nuevos conocimientos a esta área de la reproducción animal.

2.2. ESTADIO EMBRIONARIO AL MOMENTO DE LA TRANSFERENCIA

Tradicionalmente la transferencia de los embriones ovinos se realiza a las hembras receptoras en el día 6 del ciclo estral en el estadio de mórula o blastocisto, siendo depositados en la porción craneal del cuerno uterino. En ovinos los primeros trabajos realizando transferencia de embriones producidos por fertilización *in vitro* reportaron que el desarrollo embrionario fue realizado utilizando un co-cultivo de células de oviducto de oveja (Czlonkowska *et al.*, 1991). A partir de esto, nueva información ha sido generada en los sistemas de cultivo y producción *in vitro* de embriones en pequeños rumiantes (Thompson *et al.*, 2000; Cognié *et al.*, 2004), y en la actualidad el sistema preferido de cultivo *in vitro* consiste en el uso de medios sintéticos como el *Synthetic Oviductal Fluid* (SOF) (Walmsley, *et al.*, 2004). Sin embargo, aún existen ciertos factores relacionados al cultivo de estos embriones en dichos medios que limitan y disminuyen la viabilidad y sobrevivencia luego de la transferencia (Walker *et al.*, 1996a; Moore *et al.*, 2001). Bajo condiciones de cultivo *in vitro*, estos cigotos pueden ser afectados en la regulación de la transcripción de diversos genes involucrados con el desarrollo embrionario temprano y la señalización materno-embriónica (Walker *et al.*, 1996b). Así como las condiciones de cultivo, el periodo que permanecen en cultivo, y sobretodo el exceso de manipulación es vinculado a anomalías perinatales

y neonatales en bovinos principalmente pero también en corderos (Sinclair *et al.*, 1998). A pesar de esta realidad, pocos son los datos reportados referentes al estadio embrionario óptimo al momento de la transferencia. En uno de los pocos estudios con embriones ovinos frescos producidos *in vitro* en los que se comparó la transferencia en diferentes estadios (Walmsley *et al.*, 2004) se demostró una mayor tasa de nacimientos cuando la transferencia se realizó en estadios avanzados (Día 6 del desarrollo) comparado con estadios más tempranos (Día 2). Sin embargo, cuando se midió la eficiencia de la técnica estimada como corderos nacidos sobre embriones clivados, el resultado fue mejor en aquellos embriones transferidos en el Día 2. Estos resultados permitieron demostrar el potencial de la transferencia de embriones en el Día 2 sugiriendo un aumento sostenible en el número de corderos nacidos sobre el número de ovocitos recuperados. Por otra parte, se ha reportado en esta misma especie que una gran cantidad de los efectos nocivos provocados por el cultivo *in vitro* puede ser minimizado al transferir los embriones en estadio de 4 y 16 células comparado con estadios más avanzados como mórulas y blastocistos (Shirazi *et al.*, 2010). Para los pequeños rumiantes como los ovinos y caprinos, consideramos la posibilidad de transferir esos embriones en estadios más tempranos (por ejemplo, al Día 2 en el oviducto) evitando así las pérdidas de viabilidad debido al tiempo prolongado bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

2.3. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES

La criopreservación de embriones permite la disociación espacial y temporal entre la producción de los embriones y la transferencia a las hembras receptoras. Esto tiene gran importancia en la mejora genética de los rebaños al permitir el traslado de material genético entre regiones distantes. Los beneficios que permite la transferencia de embriones en el control sanitario del comercio internacional de genética no serían posibles si no existiera la posibilidad de preservar los embriones por periodos prolongados. Asimismo la criopreservación permite la conservación de especies en riesgo de extinción a través de generación de bancos de germoplasma, así como de animales de producción con genética de interés. En ovejas y las cabras desde 1976, una serie de estudios informan la crioconservación exitosa de embriones producidos *in vivo*, lo que resultó en el nacimiento de crías vivas. Trabajos iniciales dirigidos a la

criopreservación de embriones producidos *in vitro* han utilizado la metodología de congelación convencional “lenta” (Earl *et al.*, 1996; Songsasen *et al.*, 1996). Sin embargo, esa metodología desarrollada inicialmente y utilizada en embriones producidos *in vivo*, resulta en muy bajas tasas de sobrevivencia cuando se aplica a embriones producidos *in vitro* (Massip *et al.*, 2001).

2.3.1. CONGELACION CONVENCIONAL O “LENTA”

Después de los primeros trabajos de criopreservación exitosa en embriones ovinos reportados por Willadsen *et al.*, (1976) y caprinos por Bilton and Moore, (1977) donde se obtuvo el nacimiento de animales después de la transferencia de mórulas y blastocistos congelados, esta tecnología ha sido aplicada en forma creciente. Un gran número de programas MOET ha sido posible gracias a la criopreservación embrionaria contribuyendo a programas de mejora genética en diferentes regiones del mundo (Chemineau *et al.*, 1986; Barril *et al.*, 1989). Las ecuaciones teóricas sobre criopreservación diseñadas y propuestas por Mazur (1966, 1972), permitieron un importante avance en la criopreservación de gametos, determinando que una caída de la temperatura no mayor a 1 °C/min sería apropiada para congelar embriones en la mayoría de las especies. Diferentes estudios fueron realizados y determinaron que la curva de enfriamiento/congelación debe ser lo suficientemente lenta para prevenir la formación de cristales de hielo intracelular y suficientemente rápida para minimizar la exposición de la célula al efecto de la solución crioprotectora (Mazur *et al.*, 1980). En el mismo año, en un estudio reportado por Whittingan *et al.*, (1980) se determinó una curva de congelación para la conservación de embriones mamíferos a bajas temperaturas que ha pasado a ser la curva clásica utilizada con esta técnica. En este sistema, las velocidades de enfriamiento controladas permiten el intercambio extracelular e intracelular de agua sin efectos osmóticos graves o cambios en la forma celular. La velocidad de enfriamiento es cercana a 3 °C/min desde +25 °C hasta -7 °C. En esta temperatura se realiza el *seeding*, procedimiento utilizado para inducir la cristalización del medio extracelular, evitando el daño celular que se generaría por el aumento de temperatura debido al calor latente de congelación liberado por el cambio de fase. Este adelanto en la cristalización del medio favorece la salida del agua intracelular por difusión provocando así la deshidratación celular y el ingreso del

crioprotector a la célula, protegiendo de esa manera el citoplasma y citoesqueleto. A partir de esa etapa, la deshidratación continúa durante toda la fase de congelación a una velocidad de 0,3 °C/min hasta alcanzar los -30 °C, donde los embriones son mantenidos por 15 minutos y luego sumergidos en nitrógeno líquido a -196 °C. Alteraciones en la velocidad de la curva de enfriamiento generan una deshidratación progresiva de las células modificando sus propiedades físico-químicas (efecto solución) con consiguiente pérdida de la viabilidad celular (Baril *et al.*, 1993). Con el pasar de los años y a pesar de los grandes avances en esta tecnología, la curva de congelación utilizada por varios grupos con mínimas modificaciones (Mc Ginnis *et al.*, 1993; Cocero *et al.*, 2002) sigue siendo la propuesta por Willadsen *et al.*, (1976) en embriones ovinos (Figura 1).

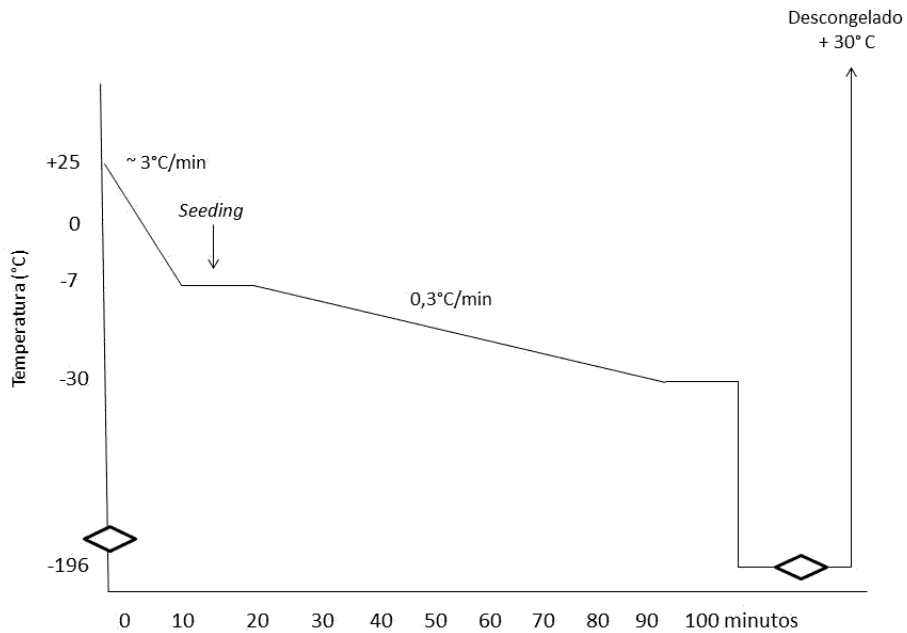


Figura 1. Curva de congelación para embriones ovinos y caprinos (modificado de Willadsen *et al.*, 1976 y Baril *et al.*, 1993).

La congelación convencional “lenta” fue el primer sistema que se utilizó para la criopreservación de embriones. Esta tecnología se ha utilizado durante años para criopreservar embriones de varias especies (Dobrinsky, 2002; Fuller and Paynter, 2007). Sin embargo, los resultados poco satisfactorios sobre todo cuando se aplica a ovocitos y embriones producidos *in vitro* (Massip *et al.*, 2001), llevó al desarrollo de técnicas más

eficientes de criopreservación como la vitrificación. Esta tecnología también puede aplicarse a embriones producidos *in vivo*, sin embargo en la actualidad la congelación convencional sigue siendo la metodología de criopreservación más adoptada en los programas de producción de embriones *in vivo* a gran escala.

2.3.2. VITRIFICACIÓN

En 1987, Massip *et al.*, demostraron con éxito la primera vitrificación de embriones bovinos que fue seguida por Gadjia *et al.* (1989) en embriones ovinos. Posteriormente esta técnica ha sido utilizada en la criopreservación de embriones ovinos producidos tanto *in vivo* como *in vitro* (Ptak *et al.*, 1999; Dattena *et al.*, 2000; Papadopoulos *et al.*, 2002). Aun así, ha sido reportado en embriones producidos *in vivo* luego de una transferencia directa (Baril *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2009). A partir de estos logros, en los últimos años han surgido nuevas estrategias para mejorar esta técnica que es una herramienta íntimamente vinculada a los procesos de manipulación y producción *in vitro* de embriones. La vitrificación es una técnica de criopreservación que consiste en una caída ultrarrápida de la temperatura hasta -196° C, pasando del estado líquido al vítreo (amorfo) sin la formación de cristales de hielo intracelular y extracelular (Kasai *et al.*, 1996). Esto se logra mediante el uso de altas concentraciones de crioprotectores. El desarrollo de nuevos aportes en el ámbito de la criobiología busca minimizar los daños estructurales causados a las células durante la criopreservación, para alcanzar una buena tasa de sobrevivencia, haciendo posible aplicar esta tecnología y hacerla económicamente viable. En las últimas décadas, la vitrificación de ovocitos y embriones ha sido propuesta como una tecnología alternativa en muchas especies (Vajta *et al.*, 2000). Diferentes métodos de vitrificación fueron desarrollados y aplicados en varias especies, incluyendo ovocitos bovinos (Vajta *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2002), suínos (Isachenko *et al.*, 1998), ovinos (Isachenko *et al.*, 2001; Silvestre *et al.*, 2006), equinos (Hurttt *et al.*, 2000), felinos (Murakami *et al.*, 2004), murinos (Park *et al.*, 2001) y humanos (Kuwayama *et al.*, 2005), además de embriones ovinos (Dattena *et al.*, 2000), bovinos (Morató *et al.*, 2008; Asgari *et al.*, 2012), caprinos (Morató *et al.*, 2011) y bubalinos (Gasparrini *et al.*, 2007) entre otros. En estos últimos años se ha demostrado que la vitrificación depende de muchos factores como el estadio de desarrollo embrionario, origen de los embriones (*in vivo* o *in vitro*), medios crioprotectores (Leoni

et al., 2002), entre otros. Vajta *et al.*, (1996) han demostrado que la viabilidad de embriones vitrificados en ovinos y bovinos es mayor en el estadio de blastocito expandido en comparación con mórulas, debido a su mayor tolerancia al enfriamiento después de la formación del blastocele. Como se documenta, el aumento de la actividad para Na^+/K^+ ATPasa que se produce durante la formación de blastocele en las células trofoblásticas pueden determinar los mecanismos de transporte más activo de los crioprotectores que conduzcan a disminuir el tiempo de exposición y a una más baja concentración de crioprotectores necesario durante la criopreservación (Watson *et al.*, 1988). Además, las células del blastocisto tienen una mayor relación de superficie a volumen que los embriones en estadios tempranos lo que puede contribuir a que tengan mayor coeficiente de permeabilidad al agua y crioprotector (Naitana *et al.*, 1996; 1997). Por otra parte, parece que la disminución en el contenido de lípidos en las células de embriones en estadios avanzados como blastocistos sería otra razón para su mayor criotolerancia en comparación con embriones en estadios tempranos (Toner *et al.*, 1986; Menezo *et al.*, 1992). Por lo tanto, podemos sugerir que los blastocistos serían más tolerantes al estrés osmótico que embriones en estadios tempranos del desarrollo. Sumado a esto, otra explicación para la mayor criotolerancia del embrión en estadios más avanzados, sería que su mayor número de células estaría relacionado con la proporción más alta de núcleo a citoplasma. Finalmente, el aumento de la criotolerancia en los estadios avanzados puede ser debido a la selección previa. De hecho, embriones comprometidos o incompetentes se pierden durante el desarrollo *in vitro* temprano, de tal forma que los estadios más avanzados representan un grupo seleccionado de embriones más competentes. En la actualidad es un concepto ampliamente aceptado por quienes utilizan las técnicas tradicionales de criopreservación que los estadios embrionarios más tardíos (mórula y blastocisto) soportan mejor este proceso que estadios más tempranos. Por este motivo se ha aumentado el interés en mejorar las condiciones de criopreservación de embriones en diferentes estadios producidos *in vitro*, en especial, aquellos en estadios tempranos. En este sentido diferentes crioprotectores y protocolos de vitrificación están siendo evaluados actualmente. Si bien los resultados son algo mejores que los obtenidos con la congelación convencional en embriones bovinos (Mahmoudzadeh *et al.*, 1994) y ovinos (Naitana *et al.*, 1997; Martinez and Matkovic, 1998) producidos *in vivo*, ninguno de ellos permite una gran sobrevivencia cuando se aplica en embriones producidos *in vitro*. Particularmente, en ovinos los embriones producidos *in vivo* son más sensibles a la criopreservación que

otros embriones como los caprinos (Traldi *et al.*, 1999). Los resultados disminuyen aún más cuando se intenta criopreservar embriones producidos *in vitro* sometidos al proceso de clonación o transgénesis. Eso muestra en parte que no sólo el efecto de las condiciones *in vitro*, sino también la falta de información y de protocolos de criopreservación efectivos para los diferentes orígenes y estadios embrionarios son factores que limitan la aplicación masiva de esta técnica a mayor escala.

Algunos de los grandes impactos negativos se deben principalmente al tipo y concentración de los crioprotectores, equilibrio del embrión en el medio, la técnica de criopreservación en la etapa de equilibrio y la etapa de calentamiento (Vajta *et al.*, 1998). Las altas concentraciones de crioprotectores son responsables por los daños celulares debido al estrés osmótico y la toxicidad química (Papadopoulos *et al.*, 2002). Durante el proceso de vitrificación, la exposición de embriones a una solución altamente concentrada de crioprotectores puede producir un daño irreversible a la organización del citoesqueleto, en particular en los estadios tempranos (Overstrom *et al.*, 1993; Naitana *et al.*, 1997). El uso de crioprotectores altamente permeables (intracelular) tales como etilenglicol (EG), se ha sugerido para reducir el daño osmótico luego del calentamiento (Voelkel *et al.*, 1992; Vajta *et al.*, 1995), incluso en aquellos embriones en estadios tempranos del desarrollo. El etilenglicol es el crioprotector permeable más difundido en protocolos de criopreservación en las especies domésticas, debido a su bajo peso molecular y menor toxicidad (Ali and Shelton, 1993; Martinez and Matkovic, 1998). En la rata, embriones de 2 células parecen ser menos permeables al etilenglicol que embriones de 4-8 células y mórulas, lo que confirmaría la información de que existe una mayor permeabilidad de embriones en estadios más avanzados comparados con aquellos embriones en estadios tempranos (Han *et al.*, 2003). Sin embargo, para que el etilenglicol permita la vitrificación es necesaria una alta concentración de crioprotector siendo a este nivel tóxico para el embrión. De esa manera, la estrategia para el éxito de la vitrificación está en la asociación de agentes crioprotectores intracelulares y extracelulares (Ali and Shelton, 1993). La presencia de otros agentes crioprotectores no permeables (extracelulares) como la sacarosa y Ficoll 70 agregados a la composición de las soluciones de vitrificación puede favorecer una protección adicional al embrión. Es conocido que la sacarosa provoca que los embriones se deshidraten, lo que reduce la probabilidad de formación de hielo intracelular y de la concentración de macromoléculas en el citoplasma facilitando de este modo la vitrificación intracelular (Rall *et al.*, 1987). El uso de otras macromoléculas tal como

Ficoll 70 facilita la vitrificación, evitando la formación de hielo extracelular durante la vitrificación y el calentamiento (Fahy *et al.*, 1984; Kasai *et al.*, 1990). Esto demuestra que son muchos los factores que pueden influir en la criotolerancia del embrión, aunque de manera general los diferentes protocolos de criopreservación ya evaluados en términos de sobrevivencia embrionaria *in vitro*, preñez y tasa de parición, presentan resultados aceptables a nivel de investigación y están ya establecidos en algunas especies.

Muchas de las crioinjurias pueden ser reversibles a través del enfriamiento más rápido reduciendo la toxicidad de los crioprotectores y disminuyendo el tiempo de exposición de la célula a temperaturas críticas (Arav *et al.*, 2002). Por lo tanto, está claramente establecido que el éxito o la sobrevivencia a la vitrificación se ve favorecida por el aumento en la tasa de enfriamiento, el aumento en la viscosidad de los medios, y una disminución del volumen de la estructura a vitrificar (Yavin and Arav, 2007). La mayoría de los estudios actuales están dirigidos a mejorar alguno de estos tres aspectos.

$$\text{Probabilidad de vitrificación} = \frac{\text{Tasa de enfriamiento} \times \text{Viscosidad}}{\text{Volumen}}$$

Para alcanzar dichas velocidades de enfriamiento ultra-rápido varias técnicas con pequeños volúmenes de solución de vitrificación fueron desarrolladas y se conocen como métodos de vitrificación de volumen mínimo o *minimum volume vitrification*. Esta información permitió mejorar la eficiencia y aparecieron algunos métodos de vitrificación como la técnica convencional en pajuelas de 0,25mL (Vajta *et al.*, 1998), método de Open Pulled Straws (OPS) (Vajta *et al.*, 1997), o el método Cryoloop (Begin *et al.*, 2003), descrito posteriormente. Recientemente fue desarrollado en Japón un nuevo procedimiento de vitrificación conocido como Cryotop cuyo principio consiste en el uso de un volumen mínimo de solución que permite una caída de la temperatura mucho más rápida, comparado con las técnicas de vitrificación mencionadas anteriormente (Kuwayama *et al.*, 2007). En algunas especies de mamíferos como murinos y humanos la vitrificación con la técnica Cryotop ha presentado resultados nunca antes alcanzados, con más del 90% de sobrevivencia embrionaria. De manera similar, en animales de producción como los bovinos (Morató *et al.*, 2008) y en las cabras (Morató *et al.*, 2011), ha generado aceptables tasas de sobrevivencia y subsecuente desarrollo embrionario. Más recientemente en 2009 fue reportada en

murinos una nueva metodología de vitrificación en Espátula presentando datos promisorios sobre la viabilidad embrionaria en estadios tempranos del desarrollo embrionario (Tsang and Chow, 2009). En estos últimos años hemos incorporado esta técnica en embriones murinos en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Institut Pasteur de Montevideo (IPMon, donde ésta técnica fue puesta a punto). Los resultados obtenidos en esta especie son excelentes, utilizándola de rutina en los últimos años (Schlapp *et al.*, 2014). Incluso hemos mejorado la manera de almacenaje incorporando un nuevo dispositivo que permite introducir los embriones vitrificados ocupando mucho menos espacio en el termo con nitrógeno líquido, a lo cual lo designamos como método Espátula MVD (Figura 2). La ventaja comparativa de la vitrificación en Espátula es que presenta bajo costo y es de fácil manipulación. Sin embargo, no existen aún reportes que comparen estas dos metodologías de vitrificación (Cryotop y Espátula) en embriones ovinos producidos *in vitro*, evaluando su efecto en diferentes estadios del desarrollo embrionario.

Si bien el procedimiento de vitrificación es una técnica alternativa de criopreservación principalmente para embriones producidos *in vitro*, su eficacia sigue siendo demasiado baja lo que limita su aplicación práctica. Por este motivo sería de gran utilidad disponer de una técnica de vitrificación que permita una alta tasa de sobrevivencia, sobretudo en estadios tempranos para transferir los embriones al oviducto y reducir así el tiempo de cultivo *in vitro*. Se ha descrito que técnicas como el Cryotop o la Espátula permiten una alta tasa de sobrevivencia en ovocitos y en embriones murinos en una fase inicial de su desarrollo. Esto posibilitaría su utilización en estadios más tempranos del desarrollo embrionario en animales de producción. Todavía no existe información disponible sobre estas técnicas aplicadas en embriones ovinos producidos *in vitro*, y mucho menos existe información sobre la sobrevivencia *in vitro* e *in vivo* de embriones vitrificados en diferentes estadios.

3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

De acuerdo a la información citada anteriormente, resulta clara la necesidad de profundizar en nuevos conocimientos acerca de la embriología ovina en condiciones de cultivo *in vitro*. Es escasa la información publicada acerca de la vitrificación de embriones ovinos producidos *in vitro*, y en particular, mediante sistemas ultra-rápidos y

de mínimo volumen. Asimismo es necesario profundizar sobre la criotolerancia de diferentes estadios embrionarios producidos *in vitro* en esta especie (por ej. Día 2 vs. Día 6). Por todo lo expuesto, es de interés obtener respuestas concretas sobre el uso de nuevas metodologías de criopreservación como la vitrificación con el método Cryotop y el método en Espátula. Ambos métodos tienen algunas particularidades específicas que favorecen el procedimiento en un volumen mínimo con una curva de enfriamiento más rápida que otras técnicas, agregando en el caso de la Espátula un bajo costo para su aplicación.

4. HIPÓTESIS

La hipótesis planteada es que los métodos de vitrificación con volumen mínimo son capaces de permitir un resultado aceptable en la sobrevivencia de embriones producidos *in vitro*. Se postula que la vitrificación en Espátula permitirá un resultado similar al Cryotop, lo que implica ventajas desde el punto de vista de su aplicación práctica. Adicionalmente, con la vitrificación al Día 2 se espera obtener una tasa de sobrevivencia *in vitro* similar al Día 6, lo que permitiría transferir los embriones más temprano reduciendo el tiempo de cultivo *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Evaluar la criotolerancia de embriones ovinos producidos *in vitro* mediante dos métodos de vitrificación en diferentes estadios de desarrollo.

5.2. Objetivos específicos:

- Evaluar la sobrevivencia de embriones producidos *in vitro* sometidos a vitrificación por las metodologías Cryotop y Espátula en diferentes estadios embrionarios (Día 2 y Día 6 luego de la fertilización).
- Determinar el desarrollo posterior a la vitrificación hasta la eclosión al Día 8 de cultivo *in vitro*.

6. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN

6.1. Diseño experimental

El estudio fue realizado en las instalaciones de la Fundación IRAUy, Instituto de Reproducción Animal (Montevideo, Uruguay), y en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Institut Pasteur de Montevideo (Montevideo, Uruguay). El plan de trabajo consistió en un diseño donde se compararon 5 grupos experimentales. Un grupo de embriones fue vitrificado en estadio de 2 a 8 células al Día 2 (Grupo D2) luego del inicio de la fertilización (Día 0), y un segundo grupo fue vitrificado en el estadio de mórula o blastocisto al Día 6 (Grupo D6). Este procedimiento se realizó con ambas metodologías de vitrificación (Cryotop vs. Espátula). Por otra parte un grupo control siguió el proceso de desarrollo *in vitro* sin someterlos a la vitrificación. Los embriones vitrificados fueron calentados y posteriormente cultivados *in vitro* al igual que el grupo control. Dada la baja eficiencia de la técnica el número de ovocitos utilizados fue 1.749 para obtener un suficiente número de embriones por grupo que permitiera alcanzar conclusiones robustas. Para esto fue necesario realizar 8 tandas o réplicas de producción *in vitro* para evaluar la tasa de desarrollo, y otras 5 réplicas para evaluar el número de células embrionarias, en prácticamente un año de actividad.

Las variables comparadas entre los grupos experimentales fueron la tasa de sobrevivencia (embriones que continúan el desarrollo/embriones vitrificados) determinada por la re-expansión a las 3 h y 24 h luego del calentamiento, la tasa de desarrollo en el Día 6 (embriones que alcanzan el Día 6/embriones Día 2), la tasa de blastocistos al Día 8 (embriones en estadio de blastocisto al Día 8/embriones Día 2), y la tasa de eclosión al Día 8 (blastocistos eclosionados/total de blastocistos en el Día 8, Día 2 y sobre los vitrificados). La morfología embrionaria fue evaluada bajo lupa estereoscópica mediante clasificación morfológica de acuerdo a las normas recomendadas por la IETS (Stringfellow and Givens, 2010). Asimismo se determinó para cada grupo experimental el número total de células al Día 7 del desarrollo en estadio de blastocisto expandido a través de la tinción de los embriones con Ioduro de propidio. Cabe mencionar que el número de células en este momento es utilizado como indicador del desarrollo embrionario futuro o de la capacidad de sobrevivencia en las

primeras semanas (Pursel *et al.*, 1985; Smith and Wilmut, 1989). Se describen en detalle las etapas referentes a la metodología de producción *in vitro* de embriones ovinos, vitrificación por la técnica Cryotop, vitrificación en Espátula y tinción celular.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE LOS EMBRIONES

El proceso de producción *in vitro* de embriones se realizó en una serie de etapas de acuerdo a la metodología que venimos desarrollando en el laboratorio y que normalmente consisten en la obtención de los ovocitos, su maduración *in vitro*, fertilización *in vitro* y cultivo *in vitro*.

7.2.1. MADURACIÓN *IN VITRO* (MIV)

7.2.1.1. Obtención de Complejos cumulus-ovocito (CCO)

Se obtuvieron CCO ovinos de ovarios de matadero, los cuales fueron transportados al laboratorio en solución fisiológica con antibiótico (50 UI/ml Penicilina y 50 µg/ml Streptomina) en un termo a 30-35°C. Se procedió a la punción de los folículos de 2-6mm de diámetro y el líquido aspirado con los CCO fue mantenido por no más de 1 hora en medio de recuperación (TCM 199, 25mM Hepes, 1% SFB, 5 UI/ml Heparina, 50 UI/ml Penicilina y 50 µg/ml Streptomina).

7.2.1.2. Maduración *in vitro*

Los CCO fueron seleccionados bajo lupa estereoscópica (SZ 61, Olympus, FL, USA) a 40x de acuerdo a la calidad y el número de capas de células del cumulus además de la homogeneidad del citoplasma. Este procedimiento fue realizado manteniendo los CCO en medio de búsqueda (TCM 199, Hepes, SFB, ATB). Posteriormente los ovocitos fueron madurados *in vitro* en gotas de 100µl de medio de maduración (MIV: TCM Hepes 199, 10% suero de oveja en estro (SOE), 10 µl/ml FSH, 10 µl/ml LH, 100 µM cisteamina, 50 UI/ml Penicilina y 50 µg/ml Estreptomina), (30 ovocitos/gota) en

placas de Petri de 35mm cubiertas con aceite mineral y luego llevados a una incubadora a 39°C de temperatura y 5% de CO₂. A las 22 horas se evaluó la maduración a través del grado de expansión de las células del cumulus, siendo inmediatamente fertilizados.

7.2.2. FERTILIZACIÓN *IN VITRO* (FIV)

Consiste en dos etapas en las que primero se realizan la selección espermática y luego la fertilización de los ovocitos propiamente dicha.

7.2.2.1. Selección espermática

El semen fue congelado previamente utilizando la metodología habitual en el laboratorio (Maxwell and Evans, 1989), y almacenado en pajuelas de 0,25mL a -196°C en N₂ líquido. Al momento de la fertilización, una pajuela fue descongelada en baño maría a 37°C por 30 segundos donde el semen fue evaluado en cuanto a motilidad progresiva y vigor espermático. Se utilizó la técnica de selección espermática de *swim up* propuesta por Parrish *et al.*, (1989) con pequeñas modificaciones la cual consiste en un mecanismo de migración ascendente “contracorriente”, en medio SOF-Fertilización (*SOF-Fert*: medio SOF, 2% SOE, 10 µg/ml heparina y 10 µg/ml hipotaurina). Se colocó el contenido de la pajuela (200ul) en 1ml de SOF-Fert en un tubo de fondo cónico (1 cm diámetro aprox.) siendo incubado por 15 min a 39°C y 5% CO₂. Luego se tomaron 800ul de la fracción superior (sobrenadante) de la muestra. Se evaluó la motilidad progresiva y vigor de los espermatozoides seleccionados en una muestra utilizando un microscopio óptico con un aumento de 100x (Nikon Eclipse E100, Tokio, Japón). Para medir la concentración, se usó una dilución 1/100 en agua destilada y el conteo se hizo en cámara de Neubauer. Una vez conocida la concentración espermática, se calculó el volumen para una dosis de un millón de espermatozoides por gota de fertilización.

7.2.2.2. Fertilización

Los ovocitos maduros fueron lavados tres veces en gotas de medio SOF-Fertilización, manteniendo las células del cumulus para la realización de la fertilización (Menchaca *et*

al., 2012b). Luego fueron colocados en una placa de Petri de 35mm en gotas de 100ul (30 ovocitos/gota) de medio SOF-Fert bajo aceite mineral. Cada gota de fertilización fue inseminada con un millón de espermatozoides previamente seleccionados por swim-up. El semen y los CCO madurados se mantuvieron incubados en estufa de cultivo por 18-22 horas a 39°C con 5% de CO₂.

7.2.3. CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

Los presumibles cigotos fueron lavados mediante sucesivo pipeteo a fines de limpiar y así eliminar los restos de espermatozoides, retiro de las células del cumulus y debrís celulares. Luego fueron lavados en gotas (50μl) de medio de desarrollo - SOFaa-Desarrollo – (adaptado de Berlinguer *et al.*, 2004) y cultivados en placas de Petri de 35mm en gotas de 100ul (30/gota) de dicho medio bajo aceite mineral. El desarrollo se realizó dentro de una cámara de tri-gaseado (5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂) en incubadora a 39°C. Se evaluó la tasa de clivaje (embriones de 2 células/total ovocitos en maduración) a las 48 horas post fertilización. En este momento se asignaron los embriones a los diferentes grupos experimentales y se evaluaron las variables descritas anteriormente. Para los grupos donde se realizó la vitrificación en el Día 2, los embriones eran inmediatamente calentados para su posterior desarrollo. En el Día 3 y Día 6 del desarrollo se realizó el cambio de medio (80% del volumen de las gotas de medio SOFaa) en todos los grupos experimentales (Vilariño *et al.*, 2012). Los embriones se mantuvieron en cultivo durante 8 días luego de la fertilización.

7.3. VITRIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES

7.3.1. Vitrificación con Cryotop

La vitrificación se realizó mediante la técnica de Cryotop al Día 2 o al Día 6 de la fertilización de acuerdo al diseño experimental. Se utilizó el dispositivo descrito para esta técnica (Kuwayama *et al.*, 2007) y los medios adecuados a partir del trabajo en embriones caprinos propuesto por Morató *et. al.*, (2011). El proceso consistió en equilibrar los embriones en una gota de 300ul de una solución de equilibrio con EG

(7,5%) y Dimetil sulfóxido (DMSO) (7,5%), en solución básica (SB) (TCM Hepes 199, 20% SFB) por 15 minutos. Posteriormente los embriones fueron transferidos a una gota de la solución de vitrificación con EG (15%), DMSO (15%), y sacarosa (0,5M) en SB lavándolos 3 veces en esta solución. Inmediatamente fueron transferidos a una segunda gota de la solución de vitrificación y lavados 2 veces más. Este procedimiento se realizó en un tiempo máximo de 90 segundos. Luego fueron colocados en la lámina del dispositivo Cryotop, haciendo una gota pequeña plana con el mínimo volumen posible (menor a 1 μ l). El dispositivo del Cryotop fue sumergido rápidamente en nitrógeno líquido y se colocó la cubierta correspondiente, almacenándolo en un tanque con nitrógeno líquido hasta su calentamiento.

Los embriones vitrificados fueron calentados en el mismo día para poder continuar con el desarrollo en las mismas condiciones que el grupo control. El calentamiento se realizó de acuerdo a la metodología descrita para esta técnica. La misma consistió en sumergir rápidamente la lámina del Cryotop en una placa de Petri de 35mm con solución de calentamiento que contiene sacarosa (1M sacarosa y TCM Hepes 199 adicionado con 20% SFB) durante 1 minuto a 37 °C. Posteriormente se lavaron los embriones en una solución decreciente de sacarosa. Se mantuvieron en una primera solución de dilución (SD; 0,5M sacarosa y TCM Hepes 199 con 20% SFB) durante 3 minutos. Luego fueron transferidos a una primera solución de lavado 1 (SL1; TCM Hepes 199 con 20% SFB) durante 5 minutos y después a la solución de lavado 2 (SL2; misma solución SL1) donde se realizaron otros 2 lavados. Por último, los embriones fueron cultivados en medio de desarrollo en las condiciones descritas anteriormente para evaluar la sobrevivencia post vitrificación, su desarrollo y la tasa de eclosión.

7.3.2. Vitrificación en Espátula

La criopreservación se realizó mediante la técnica de vitrificación en espátula al Día 2 o al Día 6 de la fertilización de acuerdo al diseño experimental. Se utilizó el dispositivo con pequeñas modificaciones (Espátula MVD) (Figura 2) y los medios descritos para esta técnica (Tsang and Chow, 2009). Inicialmente, los presumibles cigotos fueron lavados en la solución de manutención (TCM 199 Hepes, SFB 20%) y luego se llevaron a una gota de 50 μ l de una solución de equilibrio que contiene medio M2 (Sigma, St Louis, MO, EEUU (80%) con EG (10%) y DMSO (10%) durante 30 segundos. Posteriormente los embriones fueron transferidos a una gota de 50 μ l de la solución de

vitrificación que contiene EG (15%), DMSO (15%), solución FS (60%, Ficoll, sacarosa en PBS) y medio M2 (10%) durante 30 segundos. Este procedimiento se realizó en un tiempo máximo de 60 segundos. Los embriones fueron colocados sobre la lámina del dispositivo espátula, haciendo una pequeña gota con el mínimo volumen posible (menor a 1µl). El dispositivo de vitrificación fue sumergido rápidamente en nitrógeno líquido e introducido en pajuelas (0,5ml) cortadas por la mitad y llenadas hasta cierta medida con medio de desarrollo (simplemente para evitar que floten en el nitrógeno). Las pajuelas con el dispositivo fueron almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido hasta su calentamiento.

Los embriones vitrificados fueron posteriormente calentados para evaluar su tasa de sobrevivencia *in vitro* de acuerdo al diseño experimental. El calentamiento se realizó el mismo día de la vitrificación para continuar el desarrollo en las mismas condiciones que el grupo control. El mismo consistió en sumergir rápidamente la espátula en una placa de Petri de 35mm con solución de calentamiento conteniendo sacarosa (0,5 M en medio M2) a 37 °C durante 2 minutos. Posteriormente los embriones se llevaron a gotas (50 µl) de sacarosa (0,25M en medio M2) por 2 minutos. Luego fueron pasados a gotas (50 µl) de medio M2 durante 1 minuto siendo lavados dos veces en dicho medio. Por último los embriones fueron cultivados en medio de desarrollo en las condiciones descritas anteriormente para evaluar la sobrevivencia post vitrificación, su desarrollo y la tasa de eclosión. En la Figura 1 se presenta el dispositivo Espátula MVD usado para la vitrificación de embriones ovinos producidos *in vitro*.



Figura 2. Método Espátula donde se muestra: A) el dispositivo cargado con un embrión (flecha); B) Materiales usados el montaje del dispositivo Espátula integrado por Tip gel-loader 20µl Eppendorf, identificador para pajuelas de 0,25 ml, y una pajuela de 0,5ml; C) Confección de la espátula de vitrificación aplastando la punta con una fina pinza levemente calentada en el mechero, se realiza el corte de la corona del Tip gel-loader, y se corta la pajuela de 0,5ml para introducir la Espátula y que el dispositivo mantenga la longitud original de una pajuela (13,2 cm) facilitando su almacenaje en el tanque de nitrógeno líquido. D) Dispositivo de vitrificación Espátula identificado y pronto para su uso.

7.4. TINCIÓN DE EMBRIONES – COLORACIÓN CON IODURO DE PROPIDIO

Se realizaron 5 réplicas de tinción para evaluar el número total de células en embriones ovinos producidos *in vitro*. La coloración con Ioduro de propidio se realizó sobre un total de 50 embriones de 7 días de desarrollo en el estadio de blastocisto expandido (10 embriones por grupo experimental). Para realizar la coloración estos embriones fueron lavados en gotas (50 µl) de medio de manutención y luego llevados a una solución creciente de glicerol (25%, 50%, 70%) y luego fijados en una solución con glicerol 80% seguida de la tinción del núcleo. La tinción de los embriones se realizó mediante el pasaje por una solución de medio SOF desarrollo adicionado con una solución de tinción con Ioduro de Propidio. El protocolo de coloración se realizó en un tiempo de 10 minutos de incubación en solución de tinción en ausencia de luz. Los embriones se lavaron dos veces en medio de desarrollo y luego fueron montados en una pequeña gota de glicerol 80% diluido en PBS en un portaobjetos de vidrio bajo compresión con cubreobjetos. Después de la tinción se realizó la determinación del número total de células por el conteo manual en Microscopio de epifluorescencia (Olympus, FV100 IX81, Tokio, Japón).

7.5. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos de proporciones se transformaron por arcoseno y se expresan como Media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA considerando el día y el método de vitrificación como efectos principales así como su interacción. Se

consideraron diferencias significativas para un nivel de $P < 0,05$ y tendencia estadística para $P < 0,1$.

8. RESULTADOS

Los resultados globales considerando todos los ovocitos en conjunto ($n=1.749$) muestran en promedio una eficiencia de la producción *in vitro* de embriones de $79,0 \pm 3,1\%$ para la tasa de clivaje a las 48 h, y en aquellos donde no se realizó la vitrificación ($n=408$) una tasa de desarrollo al Día 6 de $62,2 \pm 5,1\%$. La proporción de embriones que sobrevivieron y continuaron desarrollándose después de la criopreservación fue influenciada por el día de la vitrificación ($P < 0,05$) y no por el método de vitrificación ($P = NS$). La tasa de sobrevivencia de los embriones vitrificados se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Tasa de sobrevivencia a las 3 y 24 horas post-calentamiento y tasa de eclosión en el Día 8 de embriones ovinos producidos *in vitro* sometidos a vitrificación por el método Cryotop o Espátula en el Día 2 o el Día 6 luego de la fertilización.

	N° embriones vitrificados	Embriones viables sobre vitrificados (%)		Eclosionados sobre viables (%)	Eclosionados sobre vitrificados (%)
		3 h	24 h		
Cryotop Día 2	165	$71,3 \pm 1,3^a$	$17,7 \pm 4,5^a$	$44,3 \pm 14,2^a$	$15,1 \pm 5,2^a$
Espátula Día 2	165	$69,6 \pm 2,4^a$	$14,6 \pm 3,5^a$	$24,2 \pm 9,2^a$	$19,9 \pm 8,4^a$
Cryotop Día 6	174	$79,7 \pm 3,1^a$	$58,6 \pm 4,6^b$	$40,9 \pm 7,9^a$	$23,6 \pm 4,9^a$
Espátula Día 6	175	$72,5 \pm 4,9^a$	$55,2 \pm 4,3^b$	$32,1 \pm 10,1^a$	$23,7 \pm 6,7^a$

Para cada columna, diferentes letras indican $P < 0,05$.

Independientemente del método de vitrificación y considerando el día del embrión como efecto principal, la tasa de sobrevivencia post-calentamiento fue de $76,1 \pm 2,9\%$ versus $70,4 \pm 1,3\%$ a las 3 h ($P = NS$) y $56,9 \pm 3,0\%$ versus $16,2 \pm 2,7\%$ a las 24 h ($P < 0,05$)

para los embriones en estadios avanzados frente a los estadios tempranos, respectivamente. La tasa de eclosión en el Día 8 fue similar para aquellos embriones vitrificados en el Día 2 ($34,3 \pm 8,8\%$) y el Día 6 ($36,5 \pm 6,5\%$) ($P=NS$). En cuanto al método de vitrificación como efecto principal, no se encontraron diferencias significativas, ya que la tasa de sobrevivencia a las 3 h ($75,5 \pm 1,9\%$ *versus* $71,0 \pm 2,6\%$) o a las 24 h ($38,2 \pm 5,9\%$ *versus* $34,9 \pm 5,7\%$) fueron similares ($P=NS$) para Cryotop y Espátula, respectivamente (Tabla 2). No se observaron diferencias en la tasa de eclosión para el método Cryotop ($42,6 \pm 8,2\%$) y el método Espátula ($28,2 \pm 6,9\%$, $P=NS$). No se encontró interacción del día por el método de vitrificación para la tasa de sobrevivencia o para la tasa de eclosión ($P=NS$).

Tabla 2. Efecto del estadio embrionario y método de vitrificación sobre la tasa de sobrevivencia y la tasa de eclosión en el Día 8 en embriones ovinos producidos *in vitro*.

	No. embriones vitrificados	Embriones viables sobre vitrificados (%)		Eclosionados sobre viables (%)	Eclosionados sobre vitrificados (%)
		3 h	24 h		
Efecto principal:					
Día de vitrificación					
Día 2	330	$70,4 \pm 1,3^a$	$16,2 \pm 2,7^b$	$34,3 \pm 8,8^a$	$17,5 \pm 1,1^a$
Día 6	349	$76,1 \pm 2,9^a$	$56,9 \pm 3,0^a$	$36,5 \pm 6,5^a$	$23,7 \pm 1,4^a$
Efecto principal:					
Método de vitrificación					
Cryotop	339	$75,5 \pm 1,9^a$	$38,2 \pm 5,9^a$	$42,6 \pm 8,2^a$	$19,4 \pm 3,7^a$
Espátula	340	$71,0 \pm 2,6^a$	$34,9 \pm 5,7^a$	$28,2 \pm 6,9^a$	$21,8 \pm 5,3^a$

Para cada columna, diferentes letras indican $P < 0,05$.

La tasa de desarrollo en el Día 6 (i.e. previo a la vitrificación) fue similar para los embriones del grupo control no vitrificados ($62,2 \pm 4,5\%$) y aquellos destinados a la vitrificación al Día 6 por el método Cryotop ($63,3 \pm 5,5\%$) o método Espátula ($61,9 \pm 4,4\%$) ($P=NS$). Los embriones que fueron vitrificados en el Día 2 alcanzaron una menor tasa de desarrollo en el Día 6 (Cryotop, $14,2 \pm 3,2\%$; Espátula $14,0 \pm 2,2\%$) en comparación con el grupo control de embriones no vitrificados ($62,2 \pm 5,1\%$ $P < 0,05$). Sin embargo, la mayoría de los embriones que sobrevivieron a las primeras 24 horas después del proceso vitrificación-calentamiento en el Día 2 fueron capaces de

desarrollarse en mórula o blastocisto en el Día 6 (Cryotop $79,9\pm 7,7\%$, 22/27; Espátula $83,9\pm 5,6\%$, 22/26; P=NS).

Tabla 3. Tasa de blastocistos en el Día 8 de embriones ovinos producidos *in vitro* sometidos a vitrificación con el método Cryotop o Espátula en el Día 2 o en el Día 6.

	Nº embriones	Blastocistos sobre clivados (%)	Eclosionados sobre blastocistos (%)	Eclosionados sobre clivados (%)	Nº total de células
Control	408	41,3±3,7 ^a	47,5±6,4 ^a	20,5±4,5 ^a	104,7±4,7 ^a
Cryotop Día 2	165	12,7±3,2 ^b	72,9±16,0 ^a	10,2±3,1 ^b	116,2±4,8 ^a
Espátula Día 2	165	11,1±2,1 ^b	53,8±14,2 ^a	6,3±2,0 ^b	108,6±3,0 ^a
Cryotop Día 6	283	31,4±3,2 ^c	44,8±8,5 ^a	14,5±3,1 ^b	107,9±3,2 ^a
Espátula Día 6	288	28,2±3,1 ^c	38,5±11,9 ^a	12,3±4,2 ^b	110,8±2,7 ^a

Para cada columna, diferentes letras indican $P < 0,05$.

La vitrificación con Cryotop o Espátula en el Día 6 permitió una mayor producción de blastocistos que en el Día 2 (Tabla 3). Sin embargo, para los dos métodos y ambos estadios embrionarios la tasa de blastocistos en el Día 8 fue inferior comparado a aquellos del grupo control que no fueron sometidos a vitrificación ($P < 0,05$). En cuanto a la tasa de eclosión en el Día 8 (i.e. a partir de los blastocistos totales) como indicador de la competencia embrionaria, no se encontraron diferencias entre aquellos embriones que no se vitrificaron y los que fueron vitrificados en el Día 2 o en el Día 6, tanto utilizando el método Cryotop o Espátula ($P = NS$). Cuando se analizó la eficiencia de la producción *in vitro* (i.e a partir del total de embriones clivados en el Día 2) no se encontró diferencia estadística en aquellos embriones que fueron sometidos a la vitrificación con Cryotop o Espátula, independiente del estadio del desarrollo embrionario (Día 2 y Día 6). Sin embargo, todos los grupos de vitrificación se vieron afectados por la criopreservación comparados al grupo control no vitrificado ($P < 0,05$) (Tabla 3). No hubo interacción del día por el método de vitrificación para la tasa de blastocistos o para la tasa de eclosión en el Día 8 ($P = NS$). Con respecto al número total de células, no se encontraron diferencias significativas en los blastocistos que fueron vitrificados por ambos métodos en diferentes estadios embrionarios en comparación con los embriones del grupo control no vitrificado (Tabla 3).

Tabla 4. Efecto del Día de vitrificación y método de vitrificación en embriones ovinos producidos por fertilización *in vitro*.

	Nº embriones	Blastocistos sobre clivados (%)	Eclosionados sobre blastocistos Día 8 (%)	Eclosionados sobre clivados (%)	Nº total células
Efecto principal: Día de vitrificación					
Control	408	41,3±3,7 ^a	47,5±6,4 ^a	20,5±4,5 ^a	104,7±4,7 ^a
Día 2	230	11,9±2,1 ^b	63,3±14,2 ^a	8,3±2,0 ^b	112,4±4,0 ^a
Día 6	571	29,8±3,0 ^c	41,6±8,0 ^a	13,4±2,9 ^b	109,3±2,8 ^a
Efecto principal: Método de vitrificación					
Control	408	41,3±3,7 ^a	47,5±6,4 ^a	20,5±4,5 ^a	104,7±4,7 ^a
Cryotop	448	22,1±3,2 ^b	58,8±8,5 ^a	12,4±3,1 ^b	112,0±4,1 ^a
Espátula	453	19,6±2,2 ^b	46,1±13,3 ^a	9,3±1,9 ^b	109,7±2,7 ^a

Para cada columna, diferentes letras indican $P < 0,05$.

Los resultados analizados por efecto principal mostraron que los embriones vitrificados con ambos métodos (Cryotop y Espátula) en los dos momentos (Día 2 y Día 6) fueron afectados por la criopreservación donde la tasa de blastocisto y la tasa de eclosión en el Día 8 fueron menores que en el grupo control no vitrificado ($P < 0,05$) (Tabla 4). Cuando se analizó el momento de vitrificación como efecto principal, se encontró que aquellos embriones criopreservados en el Día 2 poseen una más baja tasa de blastocistos (11,9±2,1%) comparado con aquellos criopreservados en el Día 6 (29,8±3,0%) ($P < 0,05$). Considerando al método de vitrificación como efecto principal, no se encontraron diferencias significativas entre ambos métodos (Cryotop 22,1±3,2%; Espátula 19,6±2,2%; $P = NS$). Cuando se analizó la tasa de eclosión en el Día 8 (i.e. a partir del total de embriones clivados en el Día 2) se encontró que los embriones vitrificados por ambos métodos son afectados por el proceso de criopreservación comparado al grupo control ($P < 0,05$). Sin embargo, no hubo efecto del estadio embrionario (Día 2: 8,3±2,0%; Día 6: 13,4±2,9%; $P = NS$) o del método de vitrificación (Cryotop 12,4±3,1%; Espátula 9,3±1,9%; $P = NS$). No hubo interacción del estadio embrionario por el método de vitrificación para la tasa de blastocistos o para la tasa de eclosión en el Día 8 ($P = NS$). De la misma manera no se encontraron diferencias

significativas para el número total de células cuando se agruparon los resultados de acuerdo a los efectos principales (P=NS).

9. DISCUSIÓN

El principal hallazgo de este estudio es la obtención de una aceptable criotolerancia con la vitrificación de embriones ovinos producidos *in vitro* en estadios tempranos y avanzados usando métodos de vitrificación con volumen mínimo y de muy alta velocidad de enfriamiento. El uso de ambos métodos Cryotop o Espátula permitieron resultados similares. Se obtuvo una mayor tasa de sobrevivencia a las 24 horas en embriones vitrificados en el Día 6 comparado con el Día 2. La tasa de desarrollo, así como la competencia para alcanzar la eclosión fueron menores con embriones sometidos a la vitrificación comparada con aquellos del grupo control no vitrificados.

La eficiencia de estos dos métodos de vitrificación Cryotop y Espátula en embriones ovinos producidos *in vitro* no había sido reportada aún. Ambos métodos permiten una alta tasa de sobrevivencia a las 3 horas después del calentamiento, que fue desde 69,6% a 79,7%, con resultados similares para todos los grupos de vitrificación. Para ambos métodos de vitrificación encontramos que embriones vitrificados en estadio de 2-8 células (en el Día 2) tienen una menor tasa de sobrevivencia a las 24 horas (aproximadamente 16%) que aquellos vitrificados en estadio de mórula o blastocisto (en el Día 6, alrededor del 55%). Aunque la sobrevivencia inmediata post-calentamiento no se vio muy afectada, una importante proporción de los embriones vitrificados en estadio temprano no sobrevivió más allá de las 24 h después del calentamiento. Este hallazgo está de acuerdo con reportes previos en bovinos, ovinos y porcinos donde los estadios más avanzados como blastocistos resultan en tasa de sobrevivencia más alta en comparación con estadios tempranos (Cocero *et al.*, 1996; Naitana *et al.*, 1997; Cuello *et al.*, 2004; Shirazy *et al.*, 2010). Nuestro estudio aporta más información al concepto de que la criotolerancia de los embriones producidos *in vitro* a la vitrificación ultrarápida y con mínimo volumen aumenta a medida que se desarrolla el embrión, al menos hasta el Día 6 luego de la fertilización.

La menor sobrevivencia de los embriones vitrificados en estadios tempranos se puede abordar desde diferentes perspectivas. Es bien conocido que las divisiones embrionarias se correlacionan con la reducción del volumen celular (Lehtonen *et al.*, 1980) y un volumen más pequeño proporciona un mejor equilibrio de los embriones con el crioprotector. Además, la progresión del embrión y el consiguiente aumento de los núcleos de citoplasma son beneficiosos para el proceso de criopreservación (Leibo *et al.*, 1993). Sumado a esto se ha propuesto que la mayor criotolerancia de blastocistos podría estar relacionada con la mayor resistencia de sus membranas celulares después de la formación del blastocele al estrés osmótico y tóxico (Naitana *et al.*, 1997). Desde el punto de vista molecular, la vitrificación de embriones en los primeros estadios del desarrollo anteriores a la activación del genoma embrionario (EGA) puede privar a los embriones de las reservas maternas de los ARNm responsable de la finalización del desarrollo del embrión antes de iniciar el EGA. Quienes proponen esta hipótesis sugieren que el momento óptimo de la vitrificación de embriones podría ser en estadios posteriores a la EGA (Asgari *et al.*, 2012). En los bovinos y ovinos, la activación del genoma embrionario ocurre en el cuarto ciclo celular entre los estadios de 8-16 células (Crosby *et al.*, 1988; Telford *et al.*, 1990). Estos conceptos podrían explicar nuestros resultados acerca de la mayor tasa de sobrevivencia obtenida en mórulas y blastocistos (i.e. Día 6) que en embriones de 2-8 células (i.e. Día 2). Desde este punto de vista sugerimos la conveniencia de utilizar los estadios avanzados para la vitrificación de embriones ovinos producidos *in vitro*, siempre que la transferencia a las receptoras vaya a realizarse al Día 6.

La competencia para alcanzar el desarrollo *in vitro* en el Día 8 de embriones vitrificados en el Día 2 o en el Día 6 se redujo por ambos métodos en comparación con los embriones no vitrificados. Sumado a esto, la tasa de desarrollo fue menor en embriones vitrificados en el Día 2 comparado al Día 6. Sin embargo, este resultado fue consecuencia de la menor tasa de sobrevivencia para los embriones vitrificados discutido anteriormente, y no se debió a una menor capacidad de desarrollo de los embriones que sobrevivieron después de la vitrificación. La tasa de eclosión expresada sobre el total de los embriones que sobrevivieron a las 24 h después de calentamiento varió de 24,2% a 44,3%. La mayoría de aquellos embriones que sobrevivieron a la vitrificación en el Día 2 fueron capaces de alcanzar el estadio de mórula o blastocisto en el Día 6 (> 80 %) y la mayoría de ellos llegaron a la eclosión en el Día 8. Sugerimos que

los embriones de 2-8 células que sobrevivieron luego de la vitrificación mediante Cryotop o Espátula mantienen una buena competencia para desarrollar y lograr la eclosión del blastocisto, al menos de manera similar a los embriones vitrificados en el Día 6. Cuando analizamos la eficiencia de la producción *in vitro* de embriones de acuerdo a la tasa de eclosión -es decir a partir del total de blastocistos en el Día 8 sobre los embriones clivados en el Día 2- no encontramos diferencias en realizar la vitrificación en estadios tempranos y o en estadios avanzados, cualquiera sea el método utilizado. Esto tiene importantes implicancias en el sentido que sería posible vitrificar embriones al Día 2 y transferirlos en el oviducto para evitar así el cultivo *in vitro* hasta el Día 6. Dado que un importante porcentaje de los embriones detienen su desarrollo durante este periodo en cultivo *in vitro*, es probable que esta estrategia permita mejorar la eficiencia aumentando el porcentaje de embriones gestantes y nacidos. De esta manera nuestros resultados abren una nueva puerta para avanzar en la mejora de esta biotecnología.

Por último, es interesante que los dos métodos de vitrificación mostraran tasas de sobrevivencia y desarrollo embrionario similares. Ambos métodos comparten las ventajas de un sistema con volumen mínimo sin estar sumergidos en una solución que permite el intercambio de calor durante el enfriamiento más rápido previniendo lesiones por el frío. Para el Cryotop la principal ventaja es que la velocidad de enfriamiento es muy rápida, cercana a 23.000°C/min (Kuwayama *et al.*, 2005). El volumen extremadamente pequeño (<0.1µl) también es útil para lograr tasas de calentamiento más altas (alrededor de 42.000C/min) evitando de este modo el proceso de recristalización (Kuwayama *et al.*, 2005). Cryotop ha sido utilizado con éxito para criopreservar ovocitos y embriones humanos (Stehlik *et al.*, 2005; Lucena *et al.*, 2006; Antinori *et al.*, 2007; Cobo *et al.*, 2007), así como ovocitos inmaduros y maduros de equinos, bovinos, ovinos y búfalos producidos *in vitro* (Chian *et al.*, 2004; Bogliolo *et al.*, 2006; Succu *et al.*, 2007; Gasparrini *et al.*, 2007). De manera similar ha sido descrito en embriones producidos *in vivo* o *in vitro* en varias especies animales. Sin embargo, según nuestro conocimiento este es el primer estudio que informa de la eficacia del método Cryotop en embriones ovinos en estadios tempranos. Por otro lado, la vitrificación con el método Espátula también representa un método de velocidad de enfriamiento ultra-rápida, usando un sistema con volumen mínimo de vitrificación (<1µl). Este novedoso método había sido descrito únicamente para murinos en cigotos,

mórulas y blastocistos, con promisorios resultados de sobrevivencia embrionaria (Tsang and Chow, 2009). Hemos realizado algunas modificaciones de este método como las ya descritas y ha sido utilizado por nuestro grupo en rumiantes y murinos (Crispo *et al.*, 2014b, Schlapp *et al.*, 2014). Hemos mantenido la principal ventaja descrita por sus inventores y es que el dispositivo es de bajo costo y fácil de montar, permitiendo conservar las muestras vitrificadas en un sistema cerrado. Hemos reducido el volumen a <0.1µl dejando solo una delgada capa de solución de vitrificación sobre el embrión, lo que permitiría una mayor velocidad de enfriamiento y calentamiento probablemente similar al Cryotop. Asimismo hemos modificado completamente el sistema de montaje ya que en lugar de utilizar un criovial para almacenar la Espátula, la hemos colocado adentro de una pajuela de 0,5 ml habitualmente utilizada para congelar semen, con un identificador de embriones en el otro extremo. Esto permite optimizar considerablemente el espacio para su almacenaje en el goblet dentro del termo de nitrógeno con implicancias prácticas interesantes. En suma, el presente estudio es el primer reporte del procedimiento Espátula para la vitrificación de embriones ovinos producidos *in vitro* en diferentes estadios del desarrollo.

10. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de estos experimentos demostraron que los métodos de vitrificación Cryotop y Espátula utilizando un volumen mínimo y muy alta velocidad de enfriamiento permiten una tasa de sobrevivencia y tasa de desarrollo aceptable en embriones ovinos producidos *in vitro* y criopreservados en diferentes estadios embrionario.

Los embriones de 2-8 células vitrificados en el Día 2 mostraron criotolerancia inferior a los vitrificados en estadio de mórula y blastocistos en el Día 6. Sin embargo, estos embriones en estadios tempranos que sobreviven a la vitrificación tienen alta capacidad de desarrollarse y alcanzar la eclosión del blastocisto, similar a la vitrificación de embriones en estadios avanzados en el Día 6.

En general, estos resultados muestran información novedosa así como prometedora para los dos métodos de vitrificación evaluados, aportando nuevo conocimiento a la criopreservación de embriones ovinos producidos por maduración y fertilización *in vitro*.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ali J and Shelton JN, 1993. Successful vitrification of day-6 sheep embryos. *J Reprod Fertil*; 99: 65–70.
2. Antinori M, Licata E, Dani G, 2007. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries. *Reprod BioMed Online*; 14: 72-79.
3. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, 2002. New trends in gametes cryopreservation. *Molecular Cell Endocrinology*; 187: 77-81.
4. Asgari V, Hosseini MS, Forouzanfar M, Hayian M, Nasr-Esfahani MH, 2012. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: Effect of embryonic block and development kinetics. *Cryobiology*; 65: 378-383.
5. Bacci ML, 2007. A brief overview of transgenic farm animals. *Vet Res Com*; 31:9-14.
6. Baldassarre H, Rao KM, Neveu N, Brochu E, Begin I, Behboodi E, 2007. Laparoscopic ovum pick-up followed by *in vitro* embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reprod Fertil Dev*; 9: 612-6.
7. Baril F, Traldi AS, Cognie Y, Leboeuf B, Bechers JF, Mermillod P, 2001. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*; 56: 147–155.
8. Baril G, Casamitjana P, Perrin J, Vallet JC, 1989. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthygiene (Berl)*; 24:101.
9. Baril G, Leboeuf B, Saumande J, 1993. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*; 40: 621–628.
10. Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL, 2003. Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2- to4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology*; 59: 1839-1850.
11. Berlinguer F, Leoni G, Bogliolo L, Pintus PP, Rosati I, Ledda S, Naitana S, 2004. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology*; 61: 1477-1486.
12. Bilton RJ and Moore NW, 1976. *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *J Biol Sci*; 9: 125–9.
13. Bogliolo L, Ariu F, Rosati I, Zedda MT, Pau S, Naitana S, 2006. Vitrification of

- bovine oocytes *in vitro* matured following vitrification. J Reprod Dev; 50: 685-403 696.
14. Chang MC, 1959. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. Nature; 184: 466-7.
 15. Chemineau P, Normant E, Ravault JP, Thimonier J, 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. J Reprod Fertil; 78: 497–504.
 16. Chian RC, Kuwayama M, Tan I, Tan J, Kato O, Nagai T, 2004. High survival rate of bovine oocytes *in vitro* matured following vitrification. J Reprod Dev; 50: 685-403 696.
 17. Cobo A, Perez S, Santos MJ, 2007. Comparison between storage of vitrified oocytes by Cryotop method in liquid nitrogen vs. vapor phase of liquid nitrogen tanks. Fertility and Sterility; 88: 591.
 18. Cocero MJ, Diaz de la Espina SM, Aguilar B, 2002. Ultrastructural characteristics of fresh an frozen–thawed ovine embryos using two cryoprotectants. Biol Reprod; 66: 1244–1258.
 19. Cocero MJ, Diaz de la Espina SM, Aguilar B, 2002. Ultrastructural characteristics of fresh an frozen–thawed ovine embryos using two cryoprotectants. Biol Reprod; 66: 1244–1258.
 20. Cocero MJ, Lopez-Sebastian A, Barragan MI, Picazo RA, 1996. Differences on post thawing survival between ovine morula and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. Cryobiology; 33: 502-507.
 21. Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P, 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. Theriogenology; 59: 171-88.
 22. Cognié Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod P, 2004. State-of-the-art production, conservation and transfer of *in-vitro*-produced embryos in small ruminants. Reprod Fertil Dev; 16: 437-45.
 23. Crispo M, Gilioli R, Carbone C, Treimun M, 2014b. Continental efforts towards cryopreservation: South America, in: M. Owen and T. van Gaans (edts), Current challenges and solutions for the cryopreservation and distribution of mouse biological resources, Springer, *in press*.
 24. Crispo M, Vilariño M, dos Santos-Neto PC, Núñez-Olivera R, Cuadro F, Barrera N, Mulet AP, Nguyen TH, Anegón I, Menchaca A, 2014a. Embryo development, fetal growth and postnatal phenotype of eGFP lambs generated by lentiviral transgenesis. Transgenic Research, *in press*.

25. Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM, 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fert*; 82: 769-775.
26. Crozet N, De Smedt V, Ahmed-Ali M, Sevellec C, 1993. Normal development following *in vitro* oocyte maturation and fertilization in the goat. *Theriogenology*; 39: 1 [abstract].
27. Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Towel J, Vázquez MJ, Roca J, Berthelot F, Martinat-Botté F, Martínez EA, 2004. Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology*; 62: 353-361.
28. Czlonkowska M, Eysymont U, Guskiewicz A, Kossakowski M, Dziak J, 1991. Birth of lambs after *in vitro* maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. *Development*; 30:34-38.
29. Damak S, Su H, Jay NP, Bullock DW, 1996. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Biotechnology*; (NY) 14:185-188.
30. Dattena M, Ptak G, Loi P, Cappai P, 2000. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo*-produced blastocysts. *Theriogenology*; 53: 1511–1519.
31. Dobrinsky JR, 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*; 57: 285-302.
32. Earl CR, Rowe JP, Kelly JM, De Barro TM, 1996. Pregnancy rates for fresh and frozen ovine IVP embryos from juvenile and adult donors. In: *Proceedings of the 13th International Congress on Animal Reproduction*, pp. 17–18.
33. Evans G and Maxwell C, 1990. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Ed. Butterworth & Co. Ltd.
34. Fahy GM, Mac Farlane DR, Angell CA, Meryman HT, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*; 21: 407–426.
35. Fuller BJ and Paynter SJ, 2007. Cryopreservation of mammalian embryos. *Met Mol Biol*; 368: 325-329.
36. Gajda B, Smorąg Z, Wierzbowski S, Jura J, Wieczorek B, 1989. Transfer of vitrified sheep morula. *Zuchthyg*; 24: 97-100.
37. Galli C, Lazzari G, 1996. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim Reprod Sci*; 42:371-379.
38. Gandolfi F, Brevini TA, Luciano AM, Modena S, Passoni L, Pocar P, 1995. *In vitro* development of preimplantation embryos from domestic species. *Toxicology. in Vitro*; 9: 607-613.

39. Gasparrini B, Attanasio L, De Rosa A, Monaco E, Di Palo R, Campanile G, 2007. Cryopreservation of *in vitro* matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volume vitrification methods. *Anim Reprod Sci*; 98: 335-342.
40. Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA, 2010. Advances in swine *in vitro* embryo production technologies. *Reprod Domest Anim*; 45: 40-8.
41. Green RE, Santos BFS, Sicherle CC, Landim-Alvarenga FC, Bicudo SD, 2009. Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. *Reprod Domest Anim*; 42: 406–410.
43. Han MS, Niwa K, Kasai M, 2003. Vitrification of rat embryos at different developmental stages, *Theriogenology*; 59: 1851–1863.
44. Hanada A, 1985. *In vitro* fertilization in goats. *Jpn. J Anim Reprod*; 31: 21-6.
45. Hinrichs K, 2010. *In vitro* production of equine embryos: state of the art. *Reprod Domest Anim*; 45: 3-8.
46. Hurtt AE, Landim-Alvarenga F, Seidel Jr GE, Squires EL, 2000. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*; 54: 119–128.
47. Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G, Folch J, 2001. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes, positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo Lett*; 22: 157–162.
48. Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F, Grishchenko V, 1998. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology*; 36: 250–253.
49. Kasai M, 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci*; 42:67-75.
50. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T, 1990. A simple method, for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil*; 89: 91–97.
51. Kuwayama M, 2007. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The CryoTop method. *Theriogenology*; 67: 73-80.
52. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP, 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod BioMed Online*; 11: 300-308.
53. Larocca C, Kmaid S, Perdigon F, Calvo J, Berroteguieta A, Sosa L, Carbo A, Viqueiras M, Roses G, Bogio JC, Ibarra D, 1992. Obtención de embriones ovinos producidos por fertilización *in vitro* en Uruguay. In 5° Congreso Nacional de

- Veterinaria, Montevideo, Uruguay. Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay; p. 101.
54. Lehtonen E, 1980. Changes in cell dimensions and intracellular contacts during cleavage stage cell cycles in mouse embryonic cells. *Embryol Exp Morphol*; 58: 231-249.
55. Leibo SP, Loskutov NM, 1993. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. *Theriogenology*; 39: 81-94.
56. Leoni G, Bogliolo L, Berlinguer F, Rosati I, 2002. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of *in vitro* derived ovine embryos. *Cryobiology*; 45: 204-212.
57. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A, 2006. Successful on going pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertility and Sterility*, 85: 108–11.
58. Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A, 1994. Comparison of two step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*; 42:1389-1397.
59. Martinez AG and Matkovic M, 1998. Cryopreservation of ovine embryos: Flow freezing and vitrification. *Theriogenology*; 49:1039-1049.
60. Massip A, 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Domest Anim*; 36:49-55.
61. Massip A, Van Der Zwalmen P, Ectors F, 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*; 27: 69-79.
62. Mazur P, 1966. Physical and chemical basis of injury in single-celled micro-organisms subjected to freezing and thawing. In: MERYMAN HT. (ed). *Cryobiology*. Academic Press, London and New York; UK; 30: 213-315.
63. Mazur P, 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos. In: *International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*; 99-114.
64. Mazur P, Leibo SP, Chu EHY, 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp Cell Res*; 71: 345-355.
65. Mc Ginnis L, Duplantis S, Youngs C, 1993. Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. *Anim Reprod Sci*; 30: 273-280.
66. Menchaca A, Vilariño M, dos Santos Neto PC, Wijma R, Pinczak A, de Castro T, Crispo M, 2012a. Producción de los primeros corderos por fertilización *in vitro* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48: 178. [abstract].

67. Menchaca A, Vilariño M, dos Santos-Neto PC, Wijma R, Crispo M, 2012b. Cumulus cells are involved in oocyte maturation and fertilization in *in vitro* produced ovine embryos. *Reprod Domest Anim*; 47: 1853. [abstract].
68. Menezo Y, Nicollet B, Harbaut N, Andre D, 1992. Freezing co-cultured human blastocysts, *Fertility and Sterility*; 58: 977–980.
69. Moore H, Rumph N, Jimenez C, Walmsley SE, Johnson WH, Pollard JW, 2001. Sheep intermediate recipient culture of *in vitro* produced bovine embryos: effect on embryonic cell distribution, chilling sensitivity, and post-thaw survival. *Theriogenology*; 55:339.
70. Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T, 2008. Embryo development and structural analysis of matured bovine oocytes vitrified in flexipletdemmigipetts. *Theriogenology*; 70: 1536-43.
71. Morató R, Romaguera R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T, 2011. Vitrification of *in vitro* produced blastocysts: Effect of oocyte donor age and development stage. *Cryobiology*; 63: 240-244.
72. Morton KM, 2008. Developmental capabilities of embryos produced *in vitro* from prepubertal lamb oocytes. *Reprod Domest Anim*; 43 (2): 137-43.
73. Morton KM, de Graaf SP, Campbell A, Tomkins LM, Maxwell WM, Evans G, 2005. Repeat ovum pick-up and *in vitro* embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reprod Domest Anim*; 40: 422-8.
74. Murakami M, Otoi T, Karja NW, Wongsrikeao P, Agung B, Suzuki T, 2004. Blastocysts derived from *in vitro* fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. *Cryobiology*; 48: 341–348.
75. Naitana S, Ledda S, Loi P, Leoni G, 1997. Polyvinyl alcohol as a defined for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim Reprod Sci*; 48:247-256.
76. Naitana S, Loi P, Ledda S, Cappai P, Dattena M, Bogliolo L, Leoni G, 1996. Effect of biopsy, vitrification on *in vitro* survival of ovine embryos at different stages of development. *Theriogenology*; 46: 813-824.
77. Overstrom EW, DUBY RT, Dobrinsky JR, Robl JM, Baguisi A, Lonergan P, Duffy P, Walsh JH, Roche JF, Boland MP, 1993. Cytoskeletal damage in vitrified and frozen embryos, *Theriogenology*; 39: 276 [abstract].

78. Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Anim Reprod Sci*; 74: 35-44.
79. Paramio MT, 2010. *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats. *Small Rum Res*; 89: 144-148.
80. Park SE, Chung HM, Cha KY, Hwang WS, Lee ES, Lim JM, 2001. Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxol, a cytoskeleton stabilizer. *Fertility and Sterility*; 75: 1177-84.
81. Parrish J, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*; 25: 591-600.
82. Perry G, IETS, 2013. 2012 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.
83. Ptak G, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P, 1999. Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol Reprod*; 61: 1568-74.
84. Pugh PA, Fukui Y, Tervit HR, Thompson JG, 1991. Developmental ability of *in vitro* matured sheep oocytes collected during the non-breeding season and fertilized *in vitro* with frozen ram semen. *Theriogenology*; 36: 771-778.
85. Pursel VG, Wall RJ, Rexroad CE, 1985. A rapid whole-mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. *Theriogenology*; 24: 687-691.
86. Rall WF, 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*; 24: 387-402.
87. Rodriguez-Dorta N, Cognié Y, Gonzalez F, Poulin N, Guignot F, Touzé JL, 2007. Effect of co-culture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified *in vitro* produced goat embryos. *Theriogenology*; 68: 908-13.
88. SBTE, Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Mudanças de tendências no mercado de embriões bovinos no Brasil, 2009. *Jornal O Embrião*; 42:5-7.
89. Schenk SL, 1878. Das Säugetierei Künstlich befruchtet ausserhalb de Muttertieres Mittheilungen aus dem Embryologischen Institute der Kaiserlich-Königlichen Universität in Wien; 1: 107.
90. Schlapp G, Meikle MN, Crispo M, 2014. Slow freezing versus vitrification of transgenic mouse embryos obtained by *in vitro* fertilization (IVF) intended for rederivation use. *Transgenic Research*; 23:891-891. [abstract].

91. Shirazi A, Soleimani M, Karimi M, Nazari H, Ahmadi E, Heidari B, 2010. Vitrification of *in vitro* produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology*; 60:204–210.
92. Silvestre MA, Y´aniz J, Salvador I, Santolaria P, López-Gatius F, 2006. Vitrification of pre-pubertal ovine cumulus–oocyte complexes: Effect of cytochalasin B pre-treatment, *Anim Reprod Sci*; 93: 176–182.
93. Sinclair KD, McEvoy TG, Carolan C, Maxfield EK, Maltin CA, Young LE, Wilmut I, Robinson JJ, Broadbent PJ, 1998. Conceptus growth and development following *in vitro* culture of ovine embryos in media supplemented with bovine serum. *Theriogenology*; 49: 218.
94. Smith LC and Wilmut I, 1989. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod*; 40: 1027-1035.
95. Songsasen N, Walmsley S, Pollard JW, Martino A, Buckrell BC, Leibo SP, 1996. Lambs produced from cryopreserved sheep embryos derived by *in vitro* fertilization of aspirated oocytes. *Can J Anim Sci*; 76: 465–467
96. Stehlik J, Stehlik P, Katajama M, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, 2005. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod BioMed Online*; 11: 53–57.
97. Stringfellow DA and Givens MD, 2010 (Ed.). *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 4th ed. Savoy, IL: IETS.
98. Succu S, Leoni G, Bebbere D, Berlinguer F, Mossa F, Bogliolo L, 2007. Vitrification devices affect structural and molecular status of *in vitro* matured ovine oocytes. *Mol Reprod Develop*; 74: 1337-1344.
99. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA, 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Develop*; 26: 90-100.
100. Thompson JG, 2000. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos: a decade of achievement. *Animal Reprod Sci*; 60-61: 263-275.
101. Toner M, Cravalho EG, Ebert KM, Overstrom EW, 1986. Cryobiophysical properties of porcine embryos. *Biol Reprod*; 34: 98 [Abstract].
102. Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Mermillod P, 1999. Comparative results of *in vitro* and *in vivo* survival of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. *Theriogenology*; 51: 175.

103. Tsang WH and Chow KL, 2009. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high capacity vitrification spatula. *Bio Techniques*; 46: 550-552.
104. Vajta G, 2000. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci*; 60: 357–364.
105. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Develop*; 51: 53-58.
106. Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H, 1997. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters*; 18: 191-195.
107. Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H, 1996. Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in straw rehydration. *Anim Reprod Sci*; 45: 191-200.
108. Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H, 1995. Direct in-straw rehydration after thawing of vitrified *in vitro* produced bovine blastocysts, *Vet Rec*; 23/30 672.
109. Viana JH, Siqueira LG, Palhao M, Camargo LS, 2012. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. *Anim Reprod*; 9:12-18.
110. Vieira AD, Mezzalana A, Barbieri DP, 2002. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*; 45: 91–94.
111. Vilariño M, Crispo M, dos Santos-Neto PC, Wijma R, Menchaca A, 2012. The effect of culture medium changes on *in vitro* production of sheep embryos *Reprod Domest Anim*, 47: 1806. [abstract].
112. Voelkel SA, Hu YX, 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen–thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*; 37: 686–697.
113. Walker SK, Hartwich KM, Seamark RF, 1996a. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology*; 45: 111-120.
114. Walker SK, Hill JL, Kleemann DO, Nancarrow CD, 1996b. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biol Reprod*; 55: 703 -708.
115. Wall RJ, 2001. Pronuclear microinjection. *Cloning and stem cells*; 3: 209-220.

116. Walmsley SE, Buckrell BC, Buschbeck C, Rumph N, Pollard JW, 2004. Rate of abnormalities in lambs from *in vitro* produced embryos transferred on Day 2 compared with Day 6 postfertilization. *Theriogenology*; 62: 195-206.
117. Wani NA, 2002. *In vitro* maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rum Res*; 44: 89-95.
118. Watson GM Kidder, 1988. Immunofluorescence assessment of the timing of appearance and cellular distribution of Na/K ATPase during mouse embryogenesis. *Dev. Biol*; 126: 80–90.
119. Willadsen SM, Polge C, Rowson LE, Moor RM, 1976. Deep freezing of sheep embryos. *J Reprod Fertil*; 46: 151–154.
120. Yavin S and Arav A, 2007. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions, *Theriogenology*; 67: 81-89.

12. PUBLICACIONES:

Publicación I: Cryotolerance of Day 2 or Day 6 *in vitro* produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods. P. C. dos Santos Neto, M. Vilarinho, N. Barrera, F. Cuadro, M. Crispo, A. Menchaca. Cryobiology (enviado).

Cryotolerance of Day 2 or Day 6 *in vitro* produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods

P. C. dos Santos Neto¹, M. Vilariño¹, N. Barrera¹, F. Cuadro¹, M. Crispo², A. Menchaca^{1*}

¹Instituto de Reproducción Animal Uruguay, Fundación IRAUy, Camino Cruz del Sur 2250, Montevideo, Uruguay.

²Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo, Uruguay.

*Corresponding author: menchaca.alejo@gmail.com (A. Menchaca)

1. ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the cryotolerance of *in vitro* produced ovine embryos submitted to vitrification at different developmental stages using two methods of minimum volume and rapid cooling rate. Embryos were vitrified at an early stage (2 to 8- cells) on Day 2 or at an advanced stage (morulae and blastocysts) on Day 6 after *in vitro* fertilization. Vitrification procedure consisted of the Cryotop (Day 2, n= 165; Day 6, n= 174) or the Spatula method (Day 2, n= 165; Day 6, n= 175). Non vitrified embryos were maintained in *in vitro* culture as a control group (n= 408). Embryo survival was determined at 3 h and 24 h after warming, development and hatching rates were evaluated on Day 6 and Day 8 after fertilization, and total cell numbers was determined on expanded blastocysts. Embryo survival at 24 h after warming progressively increased as the developmental stage progressed (P<0.05) and was not affected by the vitrification method. The ability for hatching of survived embryos was

not affected by the stage of the embryos at vitrification or by the vitrification method. Thus, the proportion of hatching from vitrified embryos was determined by the survival rate and was lower for Day 2 than Day 6 vitrified embryos. The percentage of blastocysts on Day 8 was lower for the embryos vitrified on Day 2 than Day 6 ($P < 0.05$), and was lower for both days of vitrification than for non-vitrified embryos ($P < 0.05$). No interaction of embryo stage by vitrification method was found ($P = NS$) and no significant difference was found in the blastocyst cell numbers among vitrified and non-vitrified embryos. In conclusion, both methods using minimum volume and rapid cooling rate allow acceptable survival and development rates in Day 2 and Day 6 *in vitro* produced embryos in sheep. Even though early stage embryos showed lower cryotolerance, those embryos that survive the vitrification-warming process show high development and hatching rates, similar to vitrification of morulae or blastocysts.

Keywords: embryos; vitrification; sheep; IVP; hatching rate.

2. INTRODUCTION

Since the first successful vitrification of bovine embryos [21], relevant achievements have been reported related to offspring of vitrified oocytes and embryos in several species by different methods. Initially, the best embryo survival using vitrification was obtained in advanced stages of development through the use of concentrated cryoprotectant solutions or rapid cooling rate [33]. The use of concentrated cryoprotectant is responsible for cell damage due to osmotic stress and chemical toxicity affecting embryo survival [26]. This phenomenon which is more frequently observed in oocytes and early stages embryos can be reduced through the most rapid cooling and warming rates, reducing toxicity of cryoprotectant and decreasing the time

of exposure of the cell to critical temperatures [2]. Minimum volume vitrification methods (i.e. $<1\mu\text{l}$) as Cryotop [17] have improved the probability of success of cryopreservation in some mammalian embryos such as human and murine, reporting over 90% of survival rate [13, 35]. In ruminant species the Cryotop method has shown acceptable embryo survival rates (cattle: [22]; goats: [23]). However, in sheep embryos little information about Cryotop method is available [15]. As an alternative, the novel Spatula method using minimal volume and has been reported only in mouse [32]. Spatula method has been slightly modified in our Lab (i.e. so-called Spatula MVD) and is used routinely in mouse embryos with survival rates greater than 90%, always higher than slow frozen techniques, and development rates similar to non-cryopreserved embryos [6]. To our knowledge, no information about this method in ovine embryos has been reported yet.

Consensus exist that late embryonic stages as morulae and blastocyst resist the cryopreservation process better than early stages [19, 14]. However, for *in vitro* embryo production system the main losses occur during the culture period from 2-cell embryos to blastocyst stage (e.g. approximately 80% of cleavage rate, and 30% of blastocyst rate is expected). This failure in embryo development is due in part to *in vitro* culture conditions and is partially overcome when the embryos are transferred to recipients soon after fertilization [36]. For this reason it would be useful to improve cryopreservation techniques allowing acceptable survival rates of early stages to transfer the embryos into the oviduct, avoiding *in vitro* culture. This alternative acquires more interest in specie as sheep and goats, where conventional embryo transfer is performed into the uterine horn by surgery, with similar complexity to oviduct transfer. However, little information is available about the survival rate after vitrification of early stages of ovine embryos produced by *in vitro* fertilization [28].

The aim of this study was to evaluate the embryo survival and subsequent development following vitrification performed on Day 2 or Day 6 after *in vitro* fertilization, using the Cryotop and Spatula methods in ovine embryos.

2. Material and Methods

2.1. Experimental design

The study was conducted during breeding season (January-July) at Fundación IRAUy and Transgenic and Experimental Animals Unit of Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay (34° S). Ovine embryos were produced by *in vitro* fertilization from a total of 1749 oocytes performed in 8 replicates. Day 0 was defined as the day of insemination. Embryos at early stage on Day 2 (i.e. 2 to 8 cell embryos) or advanced stages on Day 6 (i.e. morulae to expanded blastocysts) were cryopreserved by both vitrification methods, Cryotop and Spatula. Cleaved embryos on Day 2 were assigned to 5 experimental groups and were maintained in culture medium without undergoing vitrification (Control group, n=408); or were vitrified with the Cryotop method on Day 2 (n=165) or Day 6 (n=174); or were vitrified with the Spatula method on Day 2 (n=165) or Day 6 (n=175). The quality of embryos was evaluated by morphology following the criteria recommended by the International Embryo Transfer Society (IETS) [30] and those excellent and good Grade 1 embryos were assigned to each experimental group. The survival rate at 3h and 24h after vitrification-warming, development rate on Day 6 and Day 8, hatching rate, and total cell number were compared among experimental groups. Unless otherwise indicated, chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, Missouri, USA).

2.1.1. Oocyte collection

Ovaries from multiparous ewes were collected from a slaughterhouse and transported within 2 h to the laboratory at 35°C in saline solution with 50 UI/ml of Penicillin and 50ug /ml of Streptomycin. Cumulus oocyte complexes (COCs) were aspirated from 2 to 6 mm follicles using 21 gauge needle and 5ml syringe containing 0.5 ml of collection medium consisted of Tissue Culture Medium (TCM) 199 buffered Hepes (25mM) supplemented with 5 UI/ml of heparin, 1% fetal bovine serum, 50UI/ml of Penicillin and 50 ug/ml of Streptomycin. The COCs with three or more layer of cumulus cells and containing an oocyte with homogeneous cytoplasm were selected for maturation.

2.1.1. *In vitro* maturation (IVM)

Selected COCs were washed three times in holding medium containing Hepes buffered TCM 199 supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 50 UI/ml Penicillin and 50µg/ml of Streptomycin. Groups of 25-30 COCs were placed into 100µl drops of maturation medium and cultured for 24 h in 35mm Petri dish covered with embryo tested mineral oil in 5% CO₂ in humidified air atmosphere at 39°C. Maturation medium consisted of TCM 199 supplemented with 10% estrous sheep serum (ESS), 10µg/ml FSH, 10µg/ml LH, 100µM cysteamine, 50 UI/ml and 50 µg /ml of Penicillin and Streptomycin, respectively.

2.1.2. *In vitro* fertilization (IVF)

After IVM oocytes were washed three times in drops of fertilization medium containing synthetic oviduct fluid (SOF), 2% ESS, 10µg/ml heparin and 10µg/ml hypotaurine. Frozen-thawed semen was used from a single ram, previously frozen in our Lab in 0.25 ml straws containing 70×10^6 sperm in a Tris-based egg yolk extender supplemented with glycerol. Motile spermatozoa were obtained with a swim up method [27] with

slight modifications. An aliquot of sperm suspension containing 1×10^6 sperm was added to each 100 μ l drop of fertilization medium including 25-30 oocytes, covered with mineral oil. Fertilization was carried out by co-incubation of sperm and matured oocytes in fertilization medium in 5% CO₂ with humidified atmosphere at 39° C.

2.1.3. *In vitro* culture (IVC)

Approximately 22 h after insemination presumptive zygotes were denuded by gentle pipetting and received three washes in drops of development medium (SOFaaBSA bicarbonate buffered) containing SOF supplemented with BME essential amino acids 5%, MEM nonessential amino acids 2.5% and 0.4% of bovine serum albumin. Zygotes were transferred in groups of 25-30 to 100 μ l culture droplets of development medium under mineral oil. Embryonic development was conducted in 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ in humidified atmosphere at 39°C. The cleavage rate was recorded on Day 2 after fertilization (2-8 cell embryos/total oocytes). The embryos were randomly assigned to 5 experimental groups to be vitrified and warmed for further development on *in vitro* culture until Day 8. The culture medium was replaced on Day 3 and Day 6 with fresh SOFaa BSA [34].

2.2. Vitrification and warming procedure

Embryos were vitrified with the Cryotop and Spatula MVD methods on Day 2 or Day 6. The handling medium (HM) used during the vitrification and warming was TCM 199 Hepes buffered plus 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS). The two methods of vitrification differ not only in the device used to place the embryos, but also in terms of basic, equilibration, and vitrification media, as well as the procedure for vitrification and warming. All manipulations were performed at 37°C on heat stage in a warm room (25-27°C) and all the media were used at room temperature, except for the first

warming solution which was used at 37°C for both methods. Vitrified embryos were warmed within 30 min after vitrification to continue the development under the same conditions as the control group.

2.2.1. Cryotop method

This method was performed according to the published method for human oocytes and blastocysts with few modifications [23]. Embryos were submerged individually in 300 µl of equilibration solution containing HM supplemented with 7.5% (v/v) ethylene glycol (EG) and 7.5% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) for 15 min to allow initial shrinkage and recovery. Following equilibration, they were transferred to the vitrification solution containing HM supplemented with 15% (v/v) EG, 15% (v/v) DMSO and 0.5mol/l sucrose. This procedure was performed in two steps within 90 seconds. Then, the embryos were individually loaded on to the Cryotop device (KitazatoBiopharma, Fujinomiya, Japan) in a minimum volume (e.g. <1µl) for vitrification and plunged rapidly into liquid nitrogen. After vitrification (i.e. 5 to 30 min later), the Cryotop device was directly plunged into solution containing HM plus 1 mol/l sucrose at 37°C for 1 minute. The warmed embryos were then transferred to HM containing sucrose 0.5mol/l for 3 minutes and then washed twice in HM drops for 5 minutes each time. After this procedure, all embryos were transferred to development medium and then submitted to the same IVC procedures as described above.

2.2.3. Spatula MVD method

This method was performed following the procedure of minimum volume vitrification using the Spatula MVD procedure that we routinely use in our Lab [6] after some modifications from first described in mouse [32]. Spatula device was homemade using

an autoclaved 20 μ l gel-loading tip (Eppendorf, Hamburg, Germany) that was crushed near its thinner end with a fine forceps, previously gently heated on a burner to melt the tip generating a petal-like plate of approximately 1 mm². Spatula MVD method was modified from the first described method for cryopreservation of mouse embryos [32] by reducing the vitrification volume to <1 μ l, by storing the device in a smaller closed system into a 0.5 ml straw normally used for frozen semen (instead of a cryovial) requiring lesser space in the nitrogen tank, and by coupled an plugging rod for identification in the stem of the tip (Figure 1). Individual embryos were washed three times in HM and then placed in 50 μ l drops of equilibration solution containing 80% (v/v) commercial M2 medium, (with HEPES, without penicillin or streptomycin), 10% (v/v) EG and 10% (v/v) DMSO for 30 seconds. Subsequently, each embryo was transferred to a 50 μ l drops of vitrification solution containing 10% (v/v) M2 medium, 15% (v/v) EG, 15% (v/v) DMSO added to 60% (v/v) Ficoll solution (0.3g of Ficoll PM70 and 0.17g of sucrose diluted in 1 ml of PBS) for 30 seconds. Then, embryos were loaded on Spatula MVD device in a minimum volume and the solution was removed leaving only a thin layer covering the embryos (e.g. <0.1 μ l) [17], and then the device was plunged rapidly in liquid nitrogen. To allow storage in a closed system, the spatula was introduced into an empty 0.5 ml plastic straw under the liquid nitrogen 5 seconds after vitrification. Regarding the IETS recommendations the code for the color of straws and goblets used for vitrification should be blue (Figure 1).

For warming, the spatula device was removed from the straw and immediately submerged into the warming solution containing sucrose 0.5 mol/l in M2 medium at 37°C for 2 minutes. Warmed embryos were transferred to a second solution for 2 minutes containing sucrose 0.25mol/l prepared in M2 medium. After that, the embryos were washed twice in 50 μ l drops of M2 medium for 1 minute. Finally, embryos were

incubated in development medium until Day 8 under the same conditions than control group.

Figure 1. The Spatula MVD method. A) Embryo loaded (arrow) on the Spatula device in a minimum volume (e.g. $<0.1\mu\text{l}$) ready for vitrification; B) Materials used for mounting the Spatula MVD method: gel-loading tip $20\mu\text{l}$, plugging rod and 0.5ml straw; C) The tip is crushed generating a flat surface of approximately 1 mm^2 by using a fine forceps gently heated on a burner; the 0.5ml straw is cut and the total length of the device maintains the original length of the straw (i.e. 13.2 cm) for an easy storage in the goblet into the tank; D) Spatula MVD properly identified and ready for storage.

2.4. Embryo survival and development

The survival rate at 3 and 24 h post-warming was determined as the number of embryos morphologically intact with resumption of cellular division on vitrified-warmed embryos. Embryos with morphologic evidences of shrinkage or damage of the membrane or zona pellucida were considered as non-viable. The development rate was defined as the number of morulae and blastocysts obtained on Day 6 over the number of cleaved embryos on Day 2. Blastocyst rate on Day 8 was defined as the number of total blastocysts on Day 8 per cleaved embryos on Day 2. Hatching embryos were determined on total blastocysts present on Day 8 and on those cleaved on Day 2. The embryo morphology was evaluated under stereomicroscope according to the standards recommended by the IETS [30].

2.5. Cell counting

Ten expanded blastocyst per experimental group were stained with propidium iodide on Day 7. Embryos were washed in 50µl drops of development medium and were stained with Propidium Iodide during 1 min in the dark to be brought into a fixing solution with increase glycerol concentration (50% and 70% in PBS). Embryos were washed twice in development medium and then mounted in a small drop of glycerol 80% diluted in PBS on a glass slide under coverslip compression. The cell number was determined under epifluorescent microcopy (IX81, Olympus FV100, Tokyo, Japan).

2.6. Statistical analysis

The data from eight replicates were arc-sine transformed and expressed as Mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by ANOVA and differences were considered significant at a level of $P < 0.05$.

3. Results

Overall results regarding all the oocytes together (n=1749) show an average efficiency of *in vitro* embryo production of $79.0 \pm 3.1\%$ for cleavage rate, and $62.2 \pm 5.1\%$ for development rate on Day 6 from cleaved embryos for the non-vitrified control group (n=408). The proportion of embryos that survived and continued to develop after vitrification was influenced by the Day of cryopreservation ($P < 0.05$) and not by the vitrification method ($P = NS$). The survival rates of the vitrified embryos are presented in Table 1.

Table 1.

Regardless the vitrification method (i.e. embryo stage as main effect), post-warming survival rates was $76.1 \pm 2.9\%$ versus $70.4 \pm 1.3\%$ at 3 h (P=NS) and $56.9 \pm 3.0\%$ versus $16.2 \pm 2.7\%$ at 24 h after warming (P<0.05) for advanced stages versus earlier stages, respectively. Hatching rate on Day 8 (total of survived at 24h) did not differ among vitrified embryos on Day 2 ($34.3 \pm 8.8\%$) and Day 6 ($36.5 \pm 6.5\%$) (P= NS). Regarding the vitrification method as main effect, no significant differences were found since survival rate at 3 h ($75.5 \pm 1.9\%$ versus $71.0 \pm 2.6\%$) or at 24 h ($38.2 \pm 5.9\%$ versus $34.9 \pm 5.7\%$) were similar (P=NS) for Cryotop and Spatula, respectively. Hatching rate was not different among Cryotop ($42.6 \pm 8.2\%$) and Spatula method ($28.2 \pm 6.9\%$; P= NS). No interaction of embryo stage by vitrification method was found for survival or hatching rates (P=NS). When the hatching rate on Day 8 was expressed over the total vitrified embryos, no differences were found among the four cryopreserved groups (P=NS). However, regardless vitrification method lower hatching rate from vitrified was observed for Day 2 than Day 6 vitrified embryos (8.3 ± 0.5 vs. 21.5 ± 1.3 , respectively; P<0.05).

The development rate on Day 6 was similar (P=NS) for the non-vitrified control embryos ($62.2 \pm 4.5\%$) and those embryos assigned to be vitrified at this time (i.e. those destined to be vitrified on Day 6) using Cryotop ($63.3 \pm 5.5\%$) or Spatula ($61.9 \pm 4.4\%$). The embryos that had been vitrified-warmed on Day 2 reached lower development rate on Day 6 in comparison with non-vitrified embryos (P<0.05), both for the Cryotop ($14.2 \pm 3.2\%$) and Spatula methods ($14.0 \pm 2.2\%$). However, most of the embryos that were viable 24 h after vitrification-warming on Day 2 reached morula or blastocyst stage on Day 6 ($79.9 \pm 7.7\%$, 22/27 for the Cryotop; $83.9 \pm 5.6\%$, 22/26 for the Spatula; P=NS).

Table 2.

Higher number of blastocysts was obtained on Day 8 when vitrification with Cryotop or Spatula was performed on Day 6 in comparison with Day 2 (Table 2). However, for both methods and both moments of vitrification the blastocyst rate on Day 8 was lower than non-vitrified embryos ($P < 0.05$). Regarding hatching rate on Day 8 (i.e. from total blastocysts) as indicative of embryo competence, no differences were found among non-vitrified embryos and vitrified embryos on Day 2 or on Day 6 by using the Cryotop or Spatula method ($P = \text{NS}$). When the efficiency of *in vitro* embryo production was assessed according to the number of hatching embryos over cleaved oocytes, no effect was found for the vitrification methods (Cryotop *versus* Spatula; $P = \text{NS}$) or for the Day of vitrification (Day 2 *versus* Day 6; $P = \text{NS}$). However, overall results showed that the embryo viability was affected by cryopreservation since blastocyst and hatching rates were lower than non-vitrified embryos ($P < 0.05$). No significant differences were found in total cell number of blastocysts that were vitrified by both methods at different moments in comparison with the non-vitrified control embryos (Table 2).

4. Discussion

The major finding of the current study is that acceptable cryotolerance is obtained with vitrification of *in vitro* produced ovine embryos in early and advanced stages using minimum volume and ultra-rapid cooling rate procedures. No differences were found among Cryotop or Spatula methods. Survival and development rates, as well as competence to develop into hatched blastocysts were lower with vitrified embryos than

non-vitrified control embryos, and greater survival rate was obtained with Day 6 than Day 2 vitrified embryos.

The efficiency of these two vitrification methods Cryotop and Spatula performed at different developmental stages of *in vitro* produced sheep embryos had not been previously reported. Both methods allow high survival rate 3 h after warming, ranging from 69.6% to 79.7% with similar results for all vitrification groups. For both vitrification methods we found that Day 2 vitrified embryos have lower survival rate at 24 h (about 16%) than those vitrified at more advanced stages on Day 6 (about 55%). Different vitrification methods using greater volume and lower cooling rate (i.e. 0.25 ml straws) have been reported in different stages IVP sheep embryos [10, 28]. Overall these reports agree that greater cryotolerance is obtained when the IVP embryos are vitrified at advanced stages, similar than reported with frozen methods for *in vivo* derived embryos [11, 12]. Although immediate post-warming survival rate was not much affected in this study, an important proportion of vitrified early stage embryos died within 24 h after warming. This finding is in agreement with previous reports using others cryopreservation methods that showed than more advanced stages in sheep and pigs results in higher survival rates compared to earlier stage embryos [8, 9, 25]. This information support the concept that the cryotolerance of *in vitro* produced sheep embryos increases as the embryo develops. It has been proposed that the higher cryotolerance of blastocysts might be related to the higher resistance of their cellular membranes to osmotic and toxic stress after the formation of the blastocele [25]. One report in sheep embryos [28] shows similar results since blastocyst formation progressively increased after vitrification of more advanced developmental stage embryos. The authors attribute this finding within others factors to the higher sensibility

to cooling during the vitrification process in early developing stages compared to those vitrified in more advanced stages. In addition, the lower development rate of vitrified early stages can be approached from different perspectives. It is well known that the embryonic divisions are correlated with reduction in a cellular volume [18] and a smaller volume provides a better equilibration of the embryos with cryoprotectant. Furthermore, embryo progression results in a subsequent increase in nuclei to cytoplasmic ratio which is beneficial for the process of cryopreservation [19]. From another point of view, vitrification of embryos in early stages of development previous to embryonic genome activation (EGA) may deprive embryos from maternal reserves of mRNAs that are responsible for completion of embryo development before EGA initiation, suggesting that the optimal stage of embryo vitrification is post-EGA stage [3]. Our study adds new information in this sense and demonstrates that this effect is also present in those methods using minimum volume and ultra-rapid cooling rate as Cryotop or Spatula. In summary, our findings show that the survival rate of vitrified morulae and blastocysts is greater than 2-8 cells embryos, suggesting the convenience to use advanced stages for vitrification in sheep.

The competence for *in vitro* development on Day 8 of vitrified embryos on Day 2 or Day 6 decreased by both methods when compared with non-vitrified embryos. In addition, development rate was lower for embryos vitrified on Day 2 than Day 6. However, this result was a consequence of the lower survival rate for vitrified embryos discussed above, and was not due to a lower ability of survived embryos to develop after vitrification. Few studies have been conducted to evaluate the development ability after vitrification of different stages embryos produced *in vitro* in ruminant species [24, 28]. We found that the exposure of the embryos to vitrification procedure on Day 2 reduced embryo development with an important proportion of embryos that eventually

died soon after warming. However, most of those embryos that survived to vitrification on Day 2 were able to achieve morulae or blastocyst stage on Day 6 (>80%) and most of them reached hatching stage on Day 8. We suggest the hypothesis that surviving embryos after vitrification at early stage using Cryotop or Spatula maintain high competence to develop and to achieve hatching stage. When we analyzed the efficiency of *in vitro* embryo production according to hatching rate by total number of blastocysts on Day 8, we found that early stages showed similar results than advanced stages, and even similar than non-vitrified control embryos. When hatching rate was assessed from cleaved embryos on Day 2, it was lower for those embryos vitrified at early stages. In addition, for both embryo stages and both vitrification methods, the hatching rate was lower in comparison with non-vitrified embryos.

Finally, it is interesting that the two vitrification methods showed similar embryo survival and development rates. Both methods share the advantage of using a containerless system with minimum volume, which allows rapid heat exchange during cooling, preventing thus the chilling injury. In Cryotop, the main advantage is a very fast cooling rate of about 23.000 °C/min [16]. The extremely small volume (<0.1µl) is also useful to achieve higher warming rates (about 42.000 °C/min) thereby avoiding the re-crystallization process [16]. Cryotop have been successfully used to cryopreserve human oocytes and embryos [29, 20, 1, 7], immature and *in vitro* matured oocytes in horses, cow, sheep and buffalo [5, 4, 31, 13], as well as *in vitro* or *in vivo* produced embryos in several animal species. However, to our knowledge this is the first study reporting the effectiveness of the Cryotop method in early stage sheep embryos. On the other hand, vitrification Spatula is a novel ultra-rapid method described in one cell, morula and blastocyst stages in mouse embryos using a container system with minimum volume vitrification (<1µl) [32]. We have done some modifications of this method and

it is routinely used by our group in ruminant and mice embryos [6]. This method maintains the main advantages described by Tsang and Chow (2009) related to an inexpensive and easy-to-assemble device in the Lab. The modification includes the storage of vitrified samples in a closed system by inserting the device into a 0.5 ml straw, allowing an easier handling and identification system and requiring smaller space for storage in the tank. In addition, after loading we remove the solution from the Spatula surface in the same way than Cryotop to leave only a thin layer covering the embryos (i.e. $<0.1 \mu\text{l}$) [17]. The current study is the first report showing the usefulness of Spatula method for cryopreservation of sheep embryos in different stages of development.

In conclusion, this study demonstrates that both vitrification methods Cryotop and Spatula using minimum volume and ultra-rapid cooling rate allows acceptable survival and development rates in various stages of *in vitro* produced embryos in sheep. Early stage embryos vitrified on Day 2 showed lower cryotolerance than Day 6 vitrified embryos. However, those early stage embryos that survive to vitrification-warming process show high development and hatching rates, similar to vitrified morulae or blastocysts. Overall, these results show promising information for two vitrification methods that are available for preservation of *in vitro* produced embryos in sheep.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Jose Piaggio for guidance in the statistical analysis and Robert Wijma and Fatima Rodríguez for the technical assistance during the experiments. This study was financially supported by ANII (PR_FSA_2009_1_1333 grant, PR_FMV_2009_1_3096 grant), PEDECIBA (UdelaR), and Union Agriculture Group.

MC and AM are fellows of *Sistema Nacional de Investigadores* (SNI, ANII) of Uruguay.

CONFLICT OF INTEREST

At the moment of write this manuscript was conducted the authors have any conflicts of interest to declare.

5. REFERENCES

- [1]. M. Antinori, E. Licata, G. Dani, Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries, *Reprod. BioMed. Online*, 14 (2007) 72-79.
- [2]. A. Arav, S. Yavin, Y. Zeron, D. Natan, New trends in gamete's cryopreservation, *Molecular Cell Endocrinology*, 187 (2002) 77-81.
- [3]. V. Asgari, S.M. Hosseini, M. Forouzanfar, M. Hayian, M.H. Nasr-Esfahani, Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: Effect of embryonic block and development kinetics, *Cryobiology*, 65 (2012) 378-383.
- [4]. L. Bogliolo, F. Ariu, I. Rosati, M.T. Zedda, S. Pau, S. Naitana, Vitrification of immature and *in vitro* matured horse oocytes, *Reproduction, Fertility and Development*, 18 (2006) 149–50 [Abstract].
- [5]. R.C. Chian, M. Kuwayama, I. Tan, J. Tan, O. Kato, T. Nagai, High survival rate of bovine oocytes *in vitro* matured following vitrification, *J. Reprod. Dev.* 50 (2004) 685-696.
- [6]. M. Crispo, R. Gilioli, C. Carbone, M. Treimun, Continental efforts towards cryopreservation: South America, in: M. Owen and T. van Gaans (edts), Current challenges and solutions for the cryopreservation and distribution of mouse biological resources, Springer, (2014) *in press*.

- [7]. A. Cobo, S. Perez, M.J. Santos, Comparison between storage of vitrified oocytes by Cryotop method in liquid nitrogen vs. vapor phase of liquid nitrogen tanks, ***Fertility and Sterility***, 88 (2007) 591.
- [8]. M.J. Cocero, A. Lopez-Sebastian, M.I. Barragan, R.A. Picazo, Differences on post-thawing survival between ovine morula and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol, ***Cryobiology***, 33 (1996) 502-507.
- [9]. C. Cuello, M.A. Gil, I. Parrilla, J. Towel, J.M. Vázquez, J. Roca, F. Berthelot, F. Martinat-Botté, E.A. Martínez, Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures, ***Theriogenology***, 62 (2004) 353-361.
- [10]. M. Dattena, G. Ptak, P. Loi, P. Cappai, Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. ***Theriogenology***, 53 (2000) 1511–1519.
- [11]. R.M. Garcia-Garcia, A. Gonzalez-Bulnes, V. Dominguez, A. Veiga-Lopez, M.J. Cocero, Culture of early stage ovine embryos to blastocyst enhances the survival rates after cryopreservation, ***Theriogenology***, 63 (2005) 2233-2242.
- [12]. R.M. Garcia-Garcia, A. Gonzalez-Bulnes, V. Dominguez, A. Veiga-Lopez, M.J. Cocero, Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages, ***Cryobiology***, 52 (1) (2006) 108-113.
- [13]. B. Gasparrini, L. Attanasio, A. De Rosa, E. Monaco, R. Di Palo, G. Campanile, Cryopreservation of *in vitro* matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by minimum volumes vitrification methods, ***Animal Reproduction Science***, 98 (2007) 335-342.
- [14]. T. Greve, B. Avery, H. Callesen, Viability of *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos, ***Reproduction in Domestic Animals***, 28 (1993) 164-169.

- [15]. J.M. Kelly, D.O. Kleemann, M. Kuwayama, S.K. Walker, Vitrification of *in vitro* produced bovine and ovine embryos using the minimum volume cooling cryotop method, ***Reproduction, Fertility and Development***, 16 (2004)172–3.
- [16]. M. Kuwayama, G. Vajta, O. Kato, S.P. Leibo, Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes, ***Reprod. BioMed. Online***, 11 (2005) 300-308.
- [17]. M. Kuwayama, Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The CryoTop method, ***Theriogenology***, 67 (2007) 73-80.
- [18]. E. Lehtonen, Changes in cell dimensions and intracellular contacts during cleavage stage cell cycles in mouse embryonic cells, ***Embryol. Exp. Morphol***, 58 (1980) 231-249.
- [19]. S.P. Leibo, N.M. Loskutov, Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos, ***Theriogenology***, 39 (1993) 81-94.
- [20]. E. Lucena, D.P. Bernal, C. Lucena, A. Rojas, A. Moran, A. Lucena, Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes, ***Fertility and Sterility***, 85 (2006) 108–11.
- [21]. A. Massip, P. Van Der Zwalm, F. Ectors, Recent progress in cryopreservation of cattle embryos, ***Theriogenology***, 27 (1987) 69-79.
- [22]. R. Morató, D. Izquierdo, M.T. Paramio, T. Mogas, Embryo development and structural analysis of matured bovine oocytes vitrified in flexipletdemmigipetts, ***Theriogenology***, 70 (2008) 1536-43.
- [23]. R. Morató, R. Romaguera, D. Izquierdo, M.T. Paramio, T. Mogas, Vitrification of *in vitro* produced blastocysts: Effect of oocyte donor age and development stage, ***Cryobiology***, 63 (2011) 240-244.

- [24]. S. Naitana, P. Loi, S. Ledda, P. Cappai, M. Dattena, L. Bogliolo, G. Leoni, Effect of biopsy, vitrification on *in vitro* survival of ovine embryos at different stages of development, *Theriogenology*, 46 (1996) 813-824.
- [25]. S. Naitana, S. Ledda, P. Loi, G. Leoni, Polyvinyl alcohol as a defined for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development, *Animal Reproduction Science*, 48 (1997) 247-256.
- [26]. S. Papadopoulos, D. Rizos, P. Duffy, M. Wade, Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts, *Animal Reproduction Science*, 74 (2002) 35-44.
- [27]. J. Parrish, J.L.Susko-Parrish, M.L.Leibfried-Rutledge, Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen, *Theriogenology*, 25 (1986) 591–600.
- [28]. A. Shirazi, M. Soleimani, M. Karimi, H. Nazari, E. Ahmadi, B. Heidari, Vitrification of *in vitro* produced ovine embryos at various developmental stages using two methods, *Cryobiology*, 60 (2010) 204–210.
- [29]. Stehlik, J. Stehlik, P. Katajama, M. Kuwayama, V. Jambor, R. Brohammer, Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts, *Reprod. BioMedOnline*, 11 (2005) 53–57.
- [30]. D.A. Stringfellow and M.D. Givens (Ed.). 2010, *Manual of the International Embryo Transfer Society*, 4th ed. Savoy, IL: IETS.
- [31]. S. Succu, G. Leoni, D. Bebbere, F. Berlinguer, F. Mossa, L. Bogliolo, Vitrification devices affect structural and molecular status of *in vitro* matured ovine oocytes, *Molecular, Reproduction and Development*, 74 (2007) 1337-1344.
- [32]. W.H. Tsang and L. Chow, Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high capacity vitrification spatula, *Bio Techniques*, 46 (2009) 550-552.

- [33]. G. Vajta, M. Kuwayama, Improving cryopreservation systems, *Theriogenology*, 65 (2006) 234-244.
- [34]. M. Vilarinho, M. Crispo, P.C. dos Santos Neto, R. Wijma, A. Menchaca, The effect of culture medium changes on *in vitro* production of sheep embryos, *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (2012) 1806. [Abstract].
- [35]. G.B. Zhou, Y.P. Hou, F. Jin, Q.E. Yang, Z.Q. Yang, G.B. Quan, H.M. Tan, S.E. Zhu, Vitrication of mouse embryos at various stages by open-pulled straw (OPS) method, *Animal Biotechnology*, 16 (2) (2005)153-63.
- [36]. S.E. Walmsley, B.C. Buckrell, C. Buschbeck, N. Rumph, J.W. Pollard, Rate of abnormalities in lambs from *in vitro* produced embryos transferred on Day 2 compared with Day 6 postfertilization, *Theriogenology*, 62 (2004) 195–206.

Table 1. Survival rates at 3 and 24 hours post-warming and hatching rate on Day 8 of *in vitro* produced ovine embryos submitted to vitrification by Cryotop or Spatula method on Day 2 or Day 6 after fertilization.

	No. vitrified embryos	% survived from vitrified		% hatching from survived	% hatching from vitrified
		3 h	24 h		
Cryotop Day 2	165	71.3±1.3 ^a	17.7±4.5 ^a	44.3±14.2 ^a	10.2±2.9 ^a
Spatula Day 2	165	69.6±2.4 ^a	14.6±3.5 ^a	24.2±9.2 ^a	6.4±1.9 ^a
Cryotop Day 6	174	79.7±3.1 ^a	58.6±4.6 ^b	40.9±7.9 ^a	23.6±4.9 ^a
Spatula Day 6	175	72.5±4.9 ^a	55.2±4.3 ^b	32.1±10.1 ^a	19.5±6.4 ^a
Main effect:					
Day of vitrification					
Day 2	330	70.4±1.3 ^a	16.2±2.7 ^a	34.3±8.8 ^a	8.3±0.5 ^a
Day 6	349	76.1±2.9 ^a	56.9±3.0 ^b	36.5±6.5 ^a	21.5±1.3 ^b
Main effect:					
Method of vitrification					
Cryotop	339	75.5±1.9 ^a	38.2±5.9 ^a	42.6±8.2 ^a	16.9±3.3 ^a
Spatula	340	71.0±2.6 ^a	34.9±5.7 ^a	28.2±6.9 ^a	12.9±3.7 ^a

For the same column, a vs. b differ ($P < 0.05$).

Table 2. *In vitro* development on Day 8 after fertilization (Day 0) of IVP sheep embryos submitted to vitrification with Cryotop or Spatula method on Day 2 or Day 6 in comparison with non-cryopreserved embryos.

	No. embryos	% blastocysts from cleaved	% hatching from blastocysts	% hatching from cleaved	Total blastocysts cells
Control	408	41.3±3.7 ^a	47.5±6.4 ^a	20.5±4.5 ^a	104.7±4.7 ^a
Cryotop Day 2	165	12.7±3.2 ^b	72.9±16.0 ^a	10.2±2.9 ^b	116.2±4.8 ^a
Spatula Day 2	165	11.1±2.1 ^b	53.8±14.2 ^a	6.4±1.9 ^b	108.6±3.0 ^a
Cryotop Day 6	283	31.4±3.2 ^c	44.8±8.5 ^a	14.5±3.1 ^b	107.9±3.2 ^a
Spatula Day 6	288	28.2±3.1 ^c	38.5±11.9 ^a	12.3±4.2 ^b	110.8±2.7 ^a
Main effect:					
Day of vitrification					
Control	408	41.3±3.7 ^a	47.5±6.4 ^a	20.5±4.5 ^a	104.7±4.7 ^a
Day 2	230	11.9±2.1 ^b	63.3±14.2 ^a	8.3±1.4 ^b	112.4±4.0 ^a
Day 6	571	29.8±3.0 ^c	41.6±8.0 ^a	13.4±2.1 ^b	109.3±2.8 ^a
Main effect:					
Method of vitrification					
Control	408	41.3±3.7 ^a	47.5±6.4 ^a	20.5±4.5 ^a	104.7±4.7 ^a
Cryotop	448	22.1±3.2 ^b	58.8±8.5 ^a	12.4±2.2 ^b	112.0±4.1 ^a
Spatula	453	19.6±2.2 ^b	46.1±13.3 ^a	9.3±1.4 ^b	109.7±2.7 ^a

Different superscripts show significant differences (P<0.05).

Figure 1.

