



*Universidad Nacional de Córdoba*  
*Facultad de Ciencias Agropecuarias*  
*Escuela para Graduados*

---



**CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VITRO***

**Paula Rodríguez Villamil**

Tesis  
Para obtener el Grado Académico de  
Doctor en Ciencias Agropecuarias

*Córdoba, 2013*

**CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES PRODUCIDOS *IN VITRO***

**Paula Rodríguez Villamil**

**Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** Med. Vet. MVSc Ph.D Gabriel Bó .....

**Asesores:** Dr. Humberto Tríbulo (Codirector) .....

Dra. Armonia Alonso .....

**Tribunal Examinador de Tesis**

.....

.....

.....

**Presentación formal académica**

.....

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi especial agradecimiento al Dr. Gabriel Bó, por su apoyo incondicional y paciencia, porque me incentivo a realizar cada uno de los experimentos, siendo crítico y proporcionándome siempre conocimiento. Sin él no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Quiero agradecer al Dr. Humberto Tribulo y familia, por brindarme su conocimiento, apoyo y amistad durante mi estadía.

A Felipe Ledur Ongaratto, por ser siempre mi amigo, esposo, colega y principal apoyo a lo largo de este proyecto. Agradecerle, por su comprensión, paciencia y colaboración, que fueron la fuerza para no desistir nunca de este proyecto.

A Jose Maria Oviedo, Isabel Galue, Daniela Lozano, Rodrigo Cuervo, Jahir Vicente Garzon, Martin Ramos, Andres Tribulo, Monica Piccardi, por su ayuda incondicional durante la realización de los experimentos de esta tesis, pero sobre todo, les agradezco por brindarme su amistad.

Por último, a todos mis amigos e integrantes del IRAC quienes de una manera u otra siempre me ayudaron en mis estudios y me brindaron su apoyo y amistad.

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a mi esposo Felipe Ongaratto, por brindarme su apoyo incondicional y por haberme acompañado en este viaje. A mis padres Patricia Villamil y Carlos Rodríguez, por apoyarme e incentivar me a nunca desistir de seguir creciendo. A mi hermano Camilo Rodríguez por su apoyo en cada uno de los pasos que di para cumplir mis metas. A todos gracias por su amor y apoyo, sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí.

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar la viabilidad de ovocitos y embriones bovinos producidos *in vitro* vitrificados por medio de sistemas de micro-volumen en soluciones simples de etilenglicol (EG). En el experimento 1, se evaluó la efectividad de las soluciones crioprotectoras, sobre la viabilidad de los embriones. Los resultados demostraron que las soluciones simples de EG tienen la capacidad de formación de estado vítreo y baja toxicidad, resultando en mayores tasas de supervivencia que con las soluciones compuestas por EG y propanediol (PROH). En el Experimento 2 fueron evaluados dos diferentes métodos de vitrificación: las micro-pipetas de vidrio (GMP) o la vitrificación sobre superficie sólida (CVM). No encontrándose diferencias entre los dos tipos de sistemas de vitrificación. En el experimento 3, se comparó la supervivencia de los embriones producidos *in vivo* e *in vitro* criopreservados por el método de vitrificación CVM o de congelamiento lento. Las viabilidad de los embriones *in vivo* fueron superiores a los de los embriones *in vitro*, sin importar el sistema de criopreservación. Además, el sistema CVM presentó mejores tasas de supervivencia de los embriones *in vitro* que con el método de congelamiento. En el experimento 4, se evaluó la viabilidad de los embriones después de ser descongelados en un sistema de dilución dentro de la pajuela, en la presencia o no de sacarosa. Los resultados demostraron que los embriones vitrificados en soluciones compuestas por EG-PROH, obtuvieron una viabilidad superior cuando los embriones fueron diluidos en sacarosa. Por último, en el experimento 5 se evaluó el efecto de la coloración Brillante Cresyl Blue (BCB) en la selección de ovocitos y la presencia de ácido hialurónico (HA) en las soluciones de vitrificación, sobre la viabilidad de ovocitos bovinos vitrificados. Los resultados demostraron que los ovocitos seleccionados como BCB(+) tuvieron mayores tasas de desarrollo que los BCB(-). Además, el uso de HA dentro de las soluciones de vitrificación no presentó ningún efecto sobre las tasas de desarrollo. En conclusión, la vitrificación utilizando soluciones simples de EG proporciona la supervivencia embrionaria de ovocitos y embriones producidos *in vitro* y permite la utilización de sistemas simples de dilución para la transferencia directa de los embriones.

**Palabras claves:** Criopreservación, vitrificación, etilenglicol, superficie sólida, embrión, ovocito.

## ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the *in vitro* survival rates of bovine oocytes and embryos produced *in vitro* vitrified by micro-volume systems in simplified ethylene-glycol (EG) solutions. Experiment 1 evaluated the effectiveness of the EG simple or compound cryoprotectant solutions on embryo survival rates after vitrification. The results demonstrated the glass forming capacity of simplified solutions and its low toxicity, resulting in higher embryo survival rates in comparison with the compound solutions of EG and propanediol (PROH). Experiment 2, evaluated two different vitrification methods: glass micro-pipette (GMP) or solid surface vitrification (CVM). No differences were found between the two vitrification systems. Experiment 3, compared the embryo survival rates of *in vivo* and *in vitro* produced embryos cryopreserved by the CVM vitrification method or by the conventional slow freezing. Regardless the cryopreservation system used, embryo survival rates of the *in vivo* embryos were higher than the *in vitro* ones. Furthermore, the CVM method improved the survival rates of *in vitro* produced embryos in comparison with the conventional slow freezing. Experiment 4, evaluated the survival rates of embryos vitrified with the CVM method in which the vitrification media was diluted in the straw after warming using or not sucrose. The results demonstrated that embryos vitrified in EG simple solutions not show significant differences when were diluted in solutions with or without sucrose. However, the viability was higher with the sucrose solution when embryos were vitrified in EG and PROH solution. Finally, experiment 5 evaluated the effect of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining on oocyte selection and the use of hyaluronan in the vitrification solution, on embryo development of immature or mature oocytes that were vitrified with the CVM system. The results of this experiment demonstrated that the oocyte selected as BCB(+) had higher developmental rates than the oocytes selected as BCB(-). Furthermore, the use of hyaluronan in the vitrification solutions did not improve developmental rates. In conclusion, the vitrification by micro-volume using simplified EG cryoprotectant solutions provides embryo survival of oocytes and *in vitro* produced embryos, and allows the use of simplified systems for dilution of the vitrification media and for direct transfer.

**Keywords:** Cryopreservation, vitrification, ethylene-glycol, solid surface, embryo, oocyte.

# TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
<b>Capítulo 1</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Embriones producidos <i>in vivo</i> vs <i>in vitro</i> .....	2
Ovocitos .....	6
Criopreservación .....	9
Vitrificación .....	11
<i>Crioprotectores</i> .....	12
<i>Envases</i> .....	16
<b>HIPÓTESIS GENERAL</b> .....	18
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	18
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	19
 <b>Capítulo 2</b> .....	 21
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
Producción <i>in vitro</i> de embriones.....	21
Experimento 1 .....	23
<i>Experimento 1a</i> .....	23
<i>Experimento 1b</i> .....	25
<i>Experimento 1c</i> .....	26
Experimento 2.....	28
Experimento 3 .....	30
Experimento 4 .....	31
Experimento 5.....	34
<i>Experimento 5a</i> .....	36
<i>Experimento 5b</i> .....	37
Análisis Estadístico .....	37
 <b>Capítulo 3</b> .....	 38
<b>RESULTADOS</b> .....	38
Experimento 1 .....	38
Experimento 2 .....	41
Experimento 3.....	42
Experimento 4 .....	43
Experimento 5.....	44
 <b>Capítulo 4</b> .....	 49
<b>DISCUSIÓN</b> .....	49
 <b>Capítulo 5</b> .....	 61
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	61
 <b>Capítulo 6</b> .....	 63
<b>BIBLIOGRAFÍA CITADA</b> .....	63

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b> Combinaciones de crioprotectores intra y extracelulares para la evaluación de la capacidad de inducción de estado vítreo .....	23
<b>Tabla 3.1.</b> Ocurrencia del estado vítreo de diferentes soluciones durante la inmersión en nitrógeno líquido en diferentes envases.....	39
<b>Tabla 3.2.</b> Tasas de re-expansión y eclosión posterior a la exposición en diferentes intervalos de tiempo en tres diferentes soluciones de vitrificación.....	40
<b>Tabla 3.3.</b> Tasas de re-expansión y eclosión de embriones vitrificados en diferentes soluciones de vitrificación.....	41
<b>Tabla 3.4.</b> Tasas de re-expansión y de eclosión de los embriones vitrificados con dos diferentes métodos de vitrificación.....	42
<b>Tabla 3.5.</b> Tasas de viabilidad de los embriones producidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> criopreservados por diferentes métodos.....	43
<b>Tabla 3.6.</b> Tasas de re-expansión y de eclosión de blastocitos diluidos en dos diferentes soluciones dentro de la pajueta.....	44
<b>Tabla 3.7.</b> Tasas de clivaje y de producción de embriones de ovocitos inmaduras seleccionados por Brillante Cresyl Blue.....	45
<b>Tabla 3.8.</b> Tasas de clivaje y porcentaje de blastocitos producidos de ovocitos inmaduros vitrificados en dos diferentes soluciones de vitrificación .....	46
<b>Tabla 3.9.</b> Tasas de clivaje y de producción de embriones de ovocitos maduras	47

seleccionados por Brillante Cresyl Blue .....

**Tabla 3.10.** Tasas de clivaje y porcentaje de blastocitos producidos de ovocitos maduros vitrificados en dos diferentes soluciones de vitrificación..... 48

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Izq. Solución cristalizada (lechosa), sin capacidad de formación de estado vítreo. Der. Solución con capacidad de formación de estado vítreo (transparente) 24
- Figura 2.2.** Izq. Envasado por capilaridad en micro-pipetas de vidrio. Der. Envasado de microgota de vitrificación en Fyberplug 29
- Figura 2.3.** Dilución en la pajueta. (A) Fyberplug con la gota de vitrificación; (B) Pajueta plástica de 0.5ml con 200 $\mu$ L de las soluciones de dilución; (C) Fyberplug sellado con la pajueta 33
- Figura 2.4.** Esquema de la dilución del sistema CVM dentro de la pajueta. (A) Se libera la presión girando el fyberplug dentro del nitrógeno líquido y se expone la pajueta al aire por 5 seg; (B) se sumerge en baño maria a (37°C) por 30 seg; (C) Se mezcla la solución de dilución dentro de la pajueta con la gota vitrificada; (D) Pajueta de 0.5 mL con el medio de dilución que contiene el embrión para la transferencia directa. 34

## Lista de Abreviaturas

ANAVA.....	Análisis de Varianza
BCB.....	Brillante Cresyl Blue
BSA.....	Albumina sérica bovina
COC.....	Complejo cumulus ovocitos
CO <sub>2</sub> .....	Gas Carbonico
CPS.....	Closed pulled Straw
CVM.....	Método de vitrificación Cryologic
DMSO.....	Dimetilsulfoxido
EG.....	Etilenglicol
FDP.....	Flexipet denuding pipette
FSH.....	Hormona folículo estimulante
G6DPH.....	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GLY.....	Glicerol
GMP.....	Micropipeta de vidrio
IETS.....	Internacional Embryo Transfer Society

LH.....Hormona Luteinizante

M.....Molar

MDS.....Tamaño mínimo de gota

mg.....Miligramos

ml.....Mililitros

MVC.....Mínimo volumen de congelación

OPS.....Open pulled Straw

PBS.....Solución bufferada de fosfato

PROH.....Propanediol

PVA.....Polivinil Alcohol

PVP.....Polivinil pirrolidona

SE.....Solución de equilibrio

SOPS.....Superfine open-pulled Straw

SSV.....Superficie sólida de vitrificación

SV.....Solución de vitrificación

Tr.....Trealosa

UI.....Unidad internacional

$\mu$ L.....Microlitros

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

La criobiología es un área importante dentro de las biotecnologías reproductivas. La criopreservación de gametos ha sido una herramienta fundamental en la reproducción asistida de mamíferos, al permitir la conservación de células y embriones y la distribución de material genético de animales de producción, así como de especies en vía de extinción. Con la introducción del sistema de congelamiento convencional de embriones descrito por Whittingham *et al.* (1972), se consiguió la posibilidad de almacenar y distribuir material genético alrededor del mundo. Posteriormente, otros descubrimientos, como la utilización del etilenglicol como crioprotector intracelular (Voelkel y Hu, 1992), optimizó el método al permitir la transferencia directa de embriones, convirtiéndolo en un sistema comercial con millones de preñeces alrededor del mundo (Palasz y Mapletoft, 1996).

Sin embargo, con la introducción de la producción *in vitro* de embriones, se generaron nuevos retos en los sistemas de criopreservación. Datos de la producción y transferencia de embriones bovinos del último año demuestran que del total de embriones transferidos producidos *in vivo* (n=590.561), el 44,5% fueron embriones frescos y el 55,4% congelados, caso contrario de los producidos *in vitro*, de los cuales el 92% de los transferidos fueron frescos y solo el 7% criopreservados (Stroud, 2010). Esto resalta la baja criotolerancia y viabilidad que tienen aún los embriones producidos *in vitro* a los sistemas de criopreservación existentes.

Dentro de los métodos de criopreservación existentes, el sistema de vitrificación ha demostrado una mejor supervivencia de los embriones producidos *in vitro* que la que se obtiene con el método convencional, utilizado para los embriones producidos *in vivo* (Vajta, 2010). Sin embargo, su distribución aún no es totalmente comercial debido a la falta de un sistema que permita su transferencia directa. Por lo tanto, aun es necesario el desarrollo de nuevos métodos y la búsqueda de nuevas perspectivas que optimicen la vitrificación de los embriones producidos *in vitro* para así, tal vez en un futuro no muy lejano, alcanzar la comercialización de este tipo de embriones de la misma forma que han alcanzado hasta hoy los embriones producidos *in vivo*.

## **EMBRIONES PRODUCIDOS IN VIVO VS IN VITRO**

Desde el primer nacimiento bovino producido *in vitro* por Brackett *et al.* (1982), la técnica de fertilización *in vitro* se ha expandido a nivel mundial, tal como lo demuestran los datos reportados por la IETS (Thibier, 2001-2009; Stroud, 2010), con un incremento de casi el 33% anual, al llegar a producir más de 451.000 embriones *in vitro* en el 2010, en comparación con los 139.000 que se produjeron en el año 2000. Sin embargo, el hecho de que casi la mitad de las transferencias de embriones bovinos producidos *in vivo* en el mundo (55,4%, 327.525), sean realizadas con embriones congelados, y para los embriones producidos *in vitro* solo alcance al 7% (23.970), refleja la baja criotolerancia de este tipo de embriones, y la necesidad de buscar nuevos sistemas que se adapten más a sus características. Las bajas tasas de supervivencia posteriores a la criopreservación de los embriones producidos *in vitro* en comparación con los producidos *in vivo* (Assumpção *et al.*, 2008; Dinnyes y Nedambale, 2009; Yu *et al.*, 2010; Nicacio *et al.*, 2011), se deben fundamentalmente a diferencias en la composición de cada uno de ellos (Kaidi *et al.*, 2001;

Abe *et al.*, 2002; Barcelo-Fimbres y Seidel, 2011). Por ejemplo, se han reportado diferencias no solo a nivel morfológico (Abe y Hochi, 2003), sino también a nivel ultraestructural (Fair *et al.*, 2001), metabólico (Khurana y Niemman, 2000) y genómico (Rizos *et al.*, 2002a; Rizos *et al.*, 2002b; Rizos *et al.*, 2003; Corcoran *et al.*, 2006; Lonergan *et al.*, 2006).

A nivel morfológico, los embriones producidos *in vitro* presentan un citoplasma más oscuro, una menor densidad y una zona pelúcida más frágil (Pollard y Leibo, 1994; Abe y Hochi, 2003). De igual forma, su conformación es diferente a nivel ultraestructural, al presentar espacios perivitelinos más amplios, con vacuolas trofoblasticas y una notable disminución de las conexiones intracelulares y de comunicación, que los hace más intolerantes a la criopreservación (Fair *et al.*, 2001). A nivel metabólico, los embriones *in vitro*, se ha visto producen mayor cantidad de lactato y de glucosa que sus contrapartes *in vivo*, generando cambios en el pH intracelular y en las membranas, que los hace más sensibles y susceptibles a sufrir algún daño durante el congelamiento (Khurana y Niemman, 2000; Thompson, 2000).

Varios autores han resaltado que estas diferencias ocurren principalmente en la última etapa del cultivo *in vitro* (Rizos *et al.*, 2002a; Lonergan *et al.*, 2003; Abe *et al.*, 2004). Por esta razón, se ha demostrado que si se cultivan los embriones fertilizados *in vitro* en el oviducto, hay un aumento en la capacidad de esos embriones de sobrevivir a la criopreservación (Enright *et al.*, 2000).

Rutinariamente, los sistemas de cultivo utilizan suero, debido a los beneficios que este proporciona para el desarrollo embrionario, tales como factores de crecimiento, hormonas, anti-oxidantes y quelantes de metales pesados. Sin embargo, es uno de los principales causales de la acumulación de lípidos, especialmente triglicéridos, a nivel intracitoplasmático, que son los principales causantes de la disminución de la calidad embrionaria y criotolerancia de este tipo de embriones (Abe *et al.*, 2004; Barcelo-Fimbres y Seidel, 2011). De igual forma, se ha visto que el suero es el igualmente responsable de varias de las alteraciones a nivel morfológico y de desarrollo (Corcoran *et al.*, 2006), y que en ocasiones puede llegar a ser hasta pro-oxidativo, generando alteraciones a nivel mitocondrial, y conllevando a una disminución en el desarrollo (George *et al.*, 2008; Gomez *et al.*, 2008).

En los últimos años, es diversa la literatura que ha tratado de entender las diferencias en el comportamiento y desarrollo de los embriones *in vitro* frente a los *in vivo*, en especial en el estudio de las diferencias relacionadas con las bajas tasas de supervivencia posterior a la criopreservación. Sin embargo, el mecanismo específico de por qué el acumulo lipídico altera su criotolerancia aún es desconocido. Solo se sabe que está estrechamente relacionado con el contenido lipídico a nivel intracitoplasmático (Abe *et al.*, 2002).

El análisis de este contenido lipídico ya se ha hecho a través de distintas metodologías, demostrando el acumulo excesivo de gotas lipídicas dentro del citoplasma por parte de los embriones producidos *in vitro* (Rizos *et al.*, 2002a; Rizos *et al.*, 2002b; Abe y Hochi, 2003; Abe *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2010; Barcelo-Fimbres y Seidel,

2011). Sin embargo, sabemos que no es solo el hecho de la presencia de gotas lipídicas. Naturalmente, los mayores componentes de las membranas celulares son los fosfolípidos, el colesterol, así como otros lípidos menores y las proteínas, los cuales pueden ser fácilmente modificados por factores nutricionales (Adamiak *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2010), o que varían según la especie (Mc Evoy *et al.*, 2000; Dobrinsky, 2002) e inclusive raza (Visintin *et al.*, 2002; Ballard *et al.*, 2006). Sin embargo, el problema consiste en que la relación entre el colesterol y los fosfolípidos en las membranas celulares de los embriones *in vitro* no es proporcional, y que su comportamiento a través de la criopreservación varía bastante de sus contrapartes (Seidel, 2006).

Por una parte, porque el congelamiento al inducir cambios a nivel de los lípidos de membrana (fase de transición lipídica), va a modificar en el caso de embriones con un mayor porcentaje lipídico, aún más la cinética de las enzimas intramembranales, conllevando a una disminución en la homeostasis durante el congelamiento y/o descongelamiento, y por lo tanto a un daño a nivel de membrana y celular (Mazur, 1980; Visintin *et al.*, 2002; Pereira y Marques, 2008).

Por otro lado, porque las gotas lipídicas del citoplasma están asociadas estrechamente con el retículo endoplasmático y la mitocondria (Nagashima *et al.*, 1994), razón por la cual se cree que su modificación durante la criopreservación podría estar relacionada con los cambios metabólicos de los embriones durante su maduración (Abe *et al.*, 2004).

De igual forma, independiente del estrés oxidativo producido por el proceso de criopreservación (Alvarez y Storey, 1993), se ha observado que el aumento de la cantidad de lípidos genera un daño aun mayor, ya que permiten la producción de porcentajes mayores de radicales libres, a través de la peroxidación de los lípidos polinsaturados (Seidel, 2006; Barcelo-Fimbres y Seidel, 2011). Además, Rizos *et al.* (2002b), demostraron también que el aumento de lípidos aumenta la expresión de genes involucrados en la apoptosis (Bax), lo que consecuentemente disminuye las tasas de viabilidad y desarrollo de los embriones producidos *in vitro* en comparación con los *in vivo*.

## **OVOCITOS**

La criopreservación de ovocitos continúa siendo una de las técnicas más difíciles, debido a una serie de características que hacen que su viabilidad después de ser criopreservados sea menor que la de los embriones (Leibo, 1980). Los ovocitos son una única estructura al igual que los embriones, sin embargo estos están compuestos por varios elementos como: la zona pelúcida, los gránulos corticales, los microtubulos y la condensación acrosomal, lo que dificulta la manutención de su integridad a través del proceso de criopreservación (Ambrosini *et al.*, 2006).

Además, esta célula presenta un área mayor, que al estar acompañada de una serie de capas de células del cumulus, hace que sea más difícil su criopreservación. De igual forma, presentan una alta criosensibilidad debido a la susceptibilidad a la formación de hielo intracelular, la baja conductividad hidráulica y un mayor porcentaje de lípidos a nivel de citoplasma (Ruffing *et al.*, 1993).

Se ha reportado que existen también efectos a nivel sub-celular por causa de los cambios de temperatura (Liebermann, 2012). Se ha observado que la disminución de temperatura cerca de los 4°C, durante el enfriamiento, genera daños a nivel del huso cromosómico y en la extrusión de los gránulos corticales, lo que genera la rigidez de la zona pelúcida, reduciendo los porcentajes de división y fecundación y las tasas desarrollo (Saunders y Parks, 1999; Hyttel *et al.*, 2000). Además, se ha visto que temperaturas entre los 0 a 30°C comprometen la integridad de membrana, metabolismo celular y citoesqueleto de los ovocitos (Saunders y Parks, 1999; Shaw *et al.*, 2000; Liebermann, 2012). Por otra parte, se ha observado también que son más susceptibles a las especies reactivas al oxígeno que se pueden generar durante la criopreservación y aún más durante su almacenamiento lo que disminuye su viabilidad (Gupta *et al.*, 2010).

Además, los estados meioticos de los ovocitos también influyen la habilidad de los ovocitos para sobrevivir a la criopreservación; por ejemplo se ha visto que los ovocitos en estado de vesícula germinal son más sensibles que los otros estadios (Men *et al.*, 2002) y ovocitos en estados avanzados como MII son aún más resistentes, con tasas de producción de blastocitos aun mayor (Vajta *et al.*, 1998). Los mecanismos por los cuales esto ocurre se desconocen, sin embargo existen varias hipótesis de cuáles podrían ser las causas como: el daño irreversible a nivel de membrana (Wang *et al.*, 2010), una disminución en la comunicación entre ovocito y células del cumulus (Fuku *et al.*, 1995), la desorganización del huso acrosómico (Morato *et al.*, 2008), y la alteración en la distribución de los gránulos corticales (Hyttel *et al.*, 2000).

Si bien se han reportado resultados que demuestran que es posible vitrificar ovocitos bovinos (Vajta *et al.*, 1998; Men *et al.*, 2002; Albarracin *et al.*, 2005; Magnusson *et al.*, 2008; Morato *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2008; Sripunya *et al.*, 2010, Zhou *et al.*, 2010), y hasta generar preñeces (Vieira *et al.*, 2002; Abe *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2008), los resultados han sido muy variables entre los laboratorios, con tasas de producción de blastocitos que van desde 0 al 13% (Vajta *et al.*, 1998; Dinnyes *et al.*, 2000; Morato *et al.*, 2008; Sripunya *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010).

Por esta razón, uno de los sistemas que se está optimizando para aumentar las tasas de desarrollo de los ovocitos vitrificados, es el mejoramiento de las técnicas de selección, para poder partir de un pool de ovocitos más homogéneos y de mejor calidad antes del proceso de criopreservación.

La técnica más comúnmente utilizado para la selección de ovocitos es la evaluación morfológica, realizada a través de la inspección visual de la integridad del citoplasma, cantidad y compactación de las células del cumulus y homogeneidad del ooplasma (Gordon *et al.*, 2003), la cual se ha visto está estrechamente relacionada con el potencial de fertilización (Madison *et al.*, 1992). Sin embargo, este tipo de selección morfológica, es muy subjetiva, razón por la cual aún seleccionando los embriones de mejor aspecto visual, las tasas de producción *in vitro* no alcanzan a ser mayores del 30-40% (Goovaerts *et al.*, 2010).

Otro tipo de técnica de selección que existe, es el método de selección química por medio de la coloración de Cresyl Azul Brillante (BCB). Esta coloración supravital, permite

la medición de la actividad de la enzima glucosa deshidrogenasa 6-fosfato (G6DPH), la cual es sintetizada en los ovocitos en crecimiento, pero disminuye su actividad en los ovocitos que ya terminaron su etapa de crecimiento (Tian *et al.*, 1998), permitiendo evaluar los ovocitos más competentes de una forma menos subjetiva. Esta selección, al basarse en la capacidad de la G6PDH en convertir la coloración, transforma para incoloro la coloración en los ovocitos inmaduros con altas concentraciones de la enzima (BCB-), en el caso del citoplasma de los ovocitos maduros, que presentan una menor cantidad de la enzima, permite la manifestación del color azul (BCB+) (Manjunatha *et al.*, 2007). Esta coloración ha sido usada con éxito en la identificación de los ovocitos más competentes en diferentes especies; caprinos (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2002; 2003; Urdaneta *et al.*, 2003), equinos (Pereira *et al.*, 2010), porcinos (Wongsrikeao *et al.*, 2006; Antosik *et al.*, 2009; Ishizaki *et al.*, 2009; Pawlak *et al.*, 2011), bubalinos (Manjunatha *et al.*, 2007; Heleil y Fayed, 2010), murinos (Wu *et al.*, 2007) y bovinos (Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Ghanem *et al.*, 2007; Opiela *et al.*, 2008; Torner *et al.*, 2008; Hadi *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). Por esta razón, la coloración puede llegar a ser una herramienta más específica que la selección visual, permitiendo la obtención de un grupo más selecto de ovocitos competentes para ser criopreservados.

## **CRIOPRESERVACIÓN**

Desde la primera criopreservación realizada con éxito en 1972 en embriones de ratón por Whittingham *et al.*, se fueron desarrollando distintos protocolos de criopreservación de embriones en las diferentes especies domésticas. La idea principal en la generación de estas nuevas tecnologías fue dirigida al mejoramiento de los sistemas de criopreservación, intentando mantener la integridad estructural y genética y mejorar sus

tasas de supervivencia posterior al descongelamiento (Seidel Jr., 1986; Liebermann *et al.*, 2003). Dentro de los sistemas de criopreservación más utilizados están: el sistema de congelamiento convencional lento y la vitrificación. El método de congelamiento lento fue el primero en ser desarrollado (Whittingham *et al.*, 1972) y actualmente el más utilizado comercialmente (Vajta, 2000). En esta técnica las células son expuestas a crioprotectores intracelulares de bajo peso molecular, tales como Etilenglicol (EG), Glicerol (GLY) o Propanediol (PROH) (Chen *et al.*, 2005; Assumpção *et al.*, 2008; Dinnyes y Nedambale, 2009). Las curvas lentas de congelación permiten mantener el equilibrio entre los factores que pueden causar daño celular, como son la toxicidad, los cambios osmóticos y la formación de cristales de hielo intracelulares (Dobrinsky, 1996; Vajta y Kuwayama, 2006). De esta manera se produce la remoción gradual de agua de las células por medio de ósmosis, previniendo la formación de cristales de hielo (Barcelo-Fimbres y Seidel, 2011). Durante este procedimiento, los embriones normalmente van a ser equilibrados dentro de bajas concentraciones de crioprotectores, en pajuelas de inseminación de 0,25 ml, con tasas de congelación entre los 0.3 a 1°C/min, hasta alcanzar los -30 a -35°C, para posteriormente poder ser sumergidos y almacenados en el nitrógeno líquido (-196°C).

Este método de criopreservación fue el primero en ser introducido para la conservación de embriones bovinos, así como el primero en permitir la transferencia directa de embriones (Voelkel y Hu 1992), razón por la cual es el método más utilizado y con mayor número de nacimientos alrededor del mundo (Palasz y Mapletoft, 1996; Stroud, 2010). Sin embargo, sus resultados en la criopreservación de embriones *in vitro* han sido menores en comparación a los datos obtenidos en embriones *in vivo* (Hasler *et al.*, 1995; Massip *et al.*, 1995; Hochi *et al.*, 1996, Kaidi *et al.*, 2001; Alvarenga *et al.*, 2007; Dinnyes y Nedambale, 2009). Por esta razón, la vitrificación se ha convertido en una alternativa

para la criopreservación de este tipo de embriones (Vajta, 2010). Mucci *et al.* (2006) confirmaron esta observación al comparar la criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro* por medio de las dos metodologías, observando un aumento en la viabilidad a las 72 horas post-descongelamiento de los embriones que fueron conservados por medio de la vitrificación (114/265; 43%) en comparación con los que fueron congelados (33/275; 12%). De igual forma, varios autores, reportaron el aumento de las tasas de supervivencia después de la vitrificación al comparar las dos metodologías (Dinnyes *et al.*, 1995; Hasler *et al.*, 1995; Reinders *et al.*, 1995; Agca *et al.*, 1996, Vajta *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 1999; Sommerfield y Niemann, 1999; Kaidi *et al.*, 2001; Mezzalira *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010).

## VITRIFICACIÓN

La vitrificación es una metodología definida como la solidificación de un líquido producida por una extrema elevación de la viscosidad durante el enfriamiento (Fahy *et al.*, 1984). Sus curvas de enfriamiento más rápidas ( $\approx 25.000$  °C/min), permiten la formación de un estado vítreo sin la presencia de formación de hielo, disminuyendo así los daños químicos y mecánicos causados por la congelación lenta convencional (Kasai, 2002; Liebermann *et al.*, 2003; He *et al.*, 2008).

Esta metodología ha tomado gran importancia en la criopreservación no solo de embriones *in vitro*, sino también de ovocitos. Desde el primer procedimiento realizado con éxito en embriones mamíferos por Rall y Fahy en 1985, la vitrificación ha sufrido múltiples modificaciones en el intento por simplificar sus procedimientos y mejorar las

tasas de viabilidad de las estructuras. Las modificaciones que han sido realizadas sobre los diferentes factores que proporcionan las condiciones especiales para la formación del estado vítreo como: el aumento de las tasas de enfriamiento, la viscosidad de las soluciones crioprotectoras, la disminución de los volúmenes de vitrificación y el aumento de la conductividad térmica, a través de la modificación de los diferentes tipos de envases.

### *Crioprotectores*

Los crioprotectores son parte fundamental para la supervivencia embrionaria dentro del proceso de criopreservación, ya que sin su presencia las células mamíferas, independientemente de su grado de deshidratación, no sobreviven a sistemas de congelamiento por debajo de los  $-20^{\circ}\text{C}$  (Mazur, 1980).

La vitrificación al ser una técnica que consiste en la criopreservación a través del aumento de la viscosidad de las soluciones crioprotectoras, necesita de concentraciones de crioprotectores mayores (4-8 M) a las utilizadas normalmente en el congelamiento (1-2 M) (Woods *et al.*, 2004). Mientras mayor sea la concentración de los crioprotectores, mayor será la temperatura de transición para alcanzar el estado vítreo y por consiguiente menor la probabilidad de formación de hielo intracelular y/o cristalización (Saragusty y Arav, 2011). Por lo tanto, las primeras modificaciones en los sistemas de vitrificación fueron enfocadas a la disminución de los efectos tóxicos y osmóticos causados por las altas concentraciones de los crioprotectores (Kasai y Mukaida, 2004). De esta manera se trabajó con crioprotectores que tienen una alta permeabilidad (Liebermann *et al.*, 2003), permitiendo

así la reducción de los tiempos de exposición y evitando de esta manera el daño osmótico sobre las células (Kasai y Mukaida, 2004).

Dentro de los crioprotectores intracelulares, el EG es un crioprotector con un alto coeficiente de permeabilidad, razón por la cual es el más utilizado (Massip, 2001; Liebermann *et al.*, 2003; Vajta, 2010). Además, el EG tiene la capacidad de estabilizar la membrana de los embriones durante el proceso de vitrificación y la remoción rápida del mismo durante el proceso de dilución (Kasai y Mukaida, 2004). Voelkel y Hu (1992) reportaron esta efectividad, al observar que el EG permitía la transferencia directa de embriones bovinos, reduciendo los errores técnicos existentes durante el descongelamiento que existían con otros crioprotectores como el glicerol (Dochi *et al.*, 2006). Sommerfield y Niemann (1999), demostraron además que el EG puede ser utilizado en concentraciones que varían entre 1,8 hasta 8,9 M, sin causar daños a nivel celular o sobre las tasas de desarrollo de los embriones. Sin embargo, dentro de los crioprotectores intracelulares utilizados para la vitrificación, el EG es el que tiene menor capacidad de formación de estado vítreo (Baudot *et al.*, 2000), razón por la cual es el mayormente utilizado en combinación con otros crioprotectores (Emiliani *et al.*, 2000; Campos-Chillon *et al.*, 2006; Vajta y Kuwayama, 2006; Yang *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2008; Inaba *et al.*, 2011).

En cuanto a los otros crioprotectores intracelulares, varios experimentos sugieren que el PROH, el GLY y el dimetilsulfoxido (DMSO) son igualmente candidatos para ser empleados en la vitrificación de embriones (Hubalek, 2003; He *et al.*, 2008; Inaba *et al.*, 2011; Nicacio *et al.*, 2011). La estrategia para la utilización de este tipo de crioprotectores, que son más estables pero con una mayor toxicidad, es la asociación de estos con otros

agentes crioprotectores más simples, reduciendo así la toxicidad específica de los mismos. De acuerdo con algunos investigadores, la permeabilidad de la combinación de dos crioprotectores es mayor que la de sus componentes de forma individual (Vajta y Nagy, 2006). La asociación más comúnmente utilizada en vitrificación es la compuesta por EG y DMSO (Mezzalana *et al.*, 2004; Vajta y Nagy, 2006). Sin embargo, esta puede ser reemplazada por otro tipo de crioprotectores, como el EG y PROH en la vitrificación de embriones producidos *in vitro* y de ovocitos inmaduros (Vieira *et al.*, 2008; Rodríguez Villamil *et al.*, 2011).

Además de los crioprotectores permeables, se ha propuesto la adición de crioprotectores no permeables, tales como disacáridos (sacarosa, trealosa) o macromoléculas (Ficoll, polivinilalcohol, polivinilpirrolidona), para disminuir la toxicidad de los crioprotectores permeables al utilizar menores concentraciones de los mismos dentro de las células (Liebermann, 2003; Kasai y Mukaida, 2004). Este tipo de crioprotectores son generalmente menos tóxicos y pueden mitigar el daño mecánico que sufren los embriones durante la criopreservación (Kasai y Mukaida, 2004). Los sacáridos son también capaces de preservar la estructura y la integridad funcional de la membrana celular (Hotamisligil *et al.*, 1996). Disminuyen los efectos osmóticos y tóxicos al promover la deshidratación y por lo tanto facilitan la vitrificación intracelular, así como también permiten la reducción de la concentración de crioprotectores dentro de la célula (Kasai y Mukaida, 2004; Liebermann *et al.*, 2002). Los más utilizados son sacarosa, galactosa, trealosa, rafinosa (Kasai, 1996; Kuleshova *et al.*, 1999) y el Ficoll (Kasai *et al.*, 1990). Varios trabajos han demostrado la superioridad de la trealosa y la galactosa, ya que estas preservan la membrana lipídica, permiten una mejor estabilización de la membrana al

momento del enfriamiento o descongelamiento y previenen la lisis celular al reducir el movimiento de agua a través de las membranas (Saha *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2000; Eroglu *et al.*, 2003; Campos-chillon *et al.*, 2006; Seidel, 2006; Berlinguer *et al.*, 2007). Sin embargo la mayoría de laboratorios continúan usando la sacarosa (Arav y Zeron, 1997; Kuleshova *et al.*, 1999; Eroglu *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2007). Al funcionar como buffer osmótico, equilibrando la salida de las altas concentraciones de crioprotector intracelular, los sacáridos son también utilizados en el proceso de dilución de las soluciones crioprotectoras durante el descongelamiento (Kasai *et al.*, 1992; Kuleshova *et al.*, 1999).

Dentro de las macromoléculas, la primera a ser utilizada en la composición de las soluciones de vitrificación fue el polietilenglicol (Rall y Fahy, 1985). Otros polímeros menos tóxicos también han sido utilizados, como la polivinil pirrolidona (PVP) (Wowk, 2000), dextran (Kuleshova *et al.*, 2001), el alcohol polivinílico (PVA) (Checura *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2008; Rodriguez Villamil *et al.*, 2011), o el ácido hialurónico (Stojkovic *et al.*, 2002; Palasz *et al.*, 2000; 2006; 2008; Sheehan *et al.*, 2007; Block *et al.*, 2009). También se ha reportado el uso de albumina sérica bovina (BSA), la cual se aproxima más a las características del suero fetal bovino, ayudando a la suplementación del medio y a la disminución del estrés osmótico de las células (Campos-chillón *et al.*, 2006). Palasz *et al.* (2000) compararon la utilización de varias macromoléculas, BSA, ácido hialurónico y Pluronic F-68 en los medios de criopreservación, demostrando un aumento de la viabilidad de los embriones posterior al descongelamiento con el uso de cualquiera de estas macromoléculas.

El ácido hialurónico tiene además ventajas comparativas frente a las otras macromoléculas al ser un glicosaminoglicano presente en el oviducto, el cual ha demostrado tener un papel importante en la proliferación celular, migración y diferenciación celular, así como en la regulación de la expresión génica (Toole, 2001). Por otra parte, se ha visto que al ser usado en la suplementación de medios de cultivo, mejora la calidad y criotolerancia de los embriones, al evitar la formación de hielo en el espacio extracelular (Stojkovic *et al.*, 2002; Dattena *et al.*, 2007; Sheehan *et al.*, 2007; Palasz *et al.*, 2006; 2008; 2009; Block *et al.*, 2009).

### *Envases*

Los envases han sido modificados a través del tiempo, por su parte, con el objetivo de disminuir el volumen final de medio de vitrificación donde se mantiene al embrión y el material del envase, para optimizar la conductividad térmica y las tasas de enfriamiento. Las primeras modificaciones que se hicieron, fueron con la intención de minimizar el volumen de la solución de vitrificación. Las primeras a ser utilizadas fueron las pajuelas plásticas de inseminación, sin embargo al usar volúmenes  $>20 \mu\text{L}$ , solo alcanzaban tasas de enfriamiento de  $2500^\circ\text{C}/\text{min}$  (Palasz y Mapletof, 1996). Por su parte, los contenedores de menor volumen ( $<5 \mu\text{L}$ ), asociados con el contacto directo con el nitrógeno líquido, consiguieron aumentar las tasas de enfriamiento hasta casi los  $30,000^\circ\text{C}/\text{min}$  (He *et al.*, 2008). La mayoría de estos contenedores, permitieron además la disminución de las concentraciones de los crioprotectores, disminuyendo el daño tóxico y mecánico.

Entre los métodos creados están: el tamaño mínimo de la gota (MDS) (Arav, 1992),

las open-pulled straw (OPS) (Vajta et al., 1998), el volumen mínimo de congelación (MVC) (Hamawaki *et al.*, 1999), el sistema de hemi-pajuela (Vanderzwalde et al., 2000), los gel-loading tips (Tominaga y Hamada, 2001), las closed-pulled straw (CPS) (Chen *et al.*, 2001), nylon mesh (Matsumoto *et al.*, 2001), flexipet denuding pipette (FDP) (Liebermann *et al.*, 2002), las superfinely open-pulled straw (SOPS) (Isachenko *et al.*, 2003), las micropipetas plásticas de diámetro fino (Cremades *et al.*, 2004), 100  $\mu$ L pipetting tip (Hredzak *et al.*, 2005), los cryotip (Kuwayama *et al.*, 2005) y cryotop (Kuwayama *et al.*, 2005). Dentro de estos, el envase más usado es el método de la OPS, la cual alcanza tasas de enfriamiento superiores a 20.000 °C/min, disminuyendo los daños tóxicos y osmóticos en las células (Vajta *et al.*, 1998).

Modelos posteriores, consiguieron aumentar aún más las tasas de enfriamiento, al utilizar para su fabricación materiales distintos al plástico. Debido a sus características físicas, el plástico tiene una baja conductividad de calor, por lo tanto el uso de otros materiales con mayor conductividad permitieron aumentar el intercambio de calor y las tasas de enfriamiento. Por ejemplo, la utilización de las GMP de vidrio permitió alcanzar velocidades de casi 30,000°C/min (Kong *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2010). Además, se han reportado tasas de desarrollo mayores después de la vitrificación con GMP que con la OPS, debido a una mayor conductividad y la utilización de un menor volumen de crioprotectores (Kong *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2002). Otro tipo de materiales igualmente utilizados han sido: el metal, con las pajuelas metálicas (Bunn *et al.*, 2006), y el cuarzo, a través de los micro-capilares de cuarzo (Risco *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008).

Por otro lado, existen otro tipo de sistemas, que permiten el contacto directo de la

solución de vitrificación con el nitrógeno líquido como los electron micro-grids (Martino *et al.*, 1996) y los cryoloop (Lane *et al.*, 1999), al ser sistemas abiertos, o por medio del contacto a través de una superficie sólida metálica que se encuentra a la misma temperatura del nitrógeno (-196°C), como los sistemas de vitrificación sobre superficie sólida SSV (Dinnyes *et al.*, 2000) o Fyberplugs (Muthukumar *et al.*, 2008).

El sistema de superficie sólida de vitrificación alcanza curvas rápidas de enfriamiento (>20.000 °C/min), al permitir el contacto de la solución de vitrificación sobre una superficie metálica enfriada previamente dentro del nitrógeno líquido (Dinnyes *et al.*, 2000). Además, al estar la superficie por encima del nivel de nitrógeno, este sistema se evita la exposición y generación de vapores de nitrógeno, lo que hace que se alcance velocidades de enfriamiento aún mayores ( $\approx 30.000^\circ\text{C}/\text{min}$ ) (Sansinena *et al.*, 2011).

## **HIPÓTESIS GENERAL**

La vitrificación en micro-volumen utilizando soluciones simples de etilenglicol proporciona la supervivencia de ovocitos inmaduros y embriones producidos *in vitro* y permiten el desarrollo de sistemas simples de dilución para la transferencia directa de los embriones.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar las tasas de viabilidad de ovocitos y embriones bovinos producidos *in vitro* vitrificados por medio de sistemas de micro-volumen en soluciones simples de etilenglicol.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar la capacidad de formación de estado vítreo de las soluciones crioprotectoras al ser expuestas a nitrógeno líquido (Experimento 1a).
- Evaluar el efecto de la toxicidad de las soluciones crioprotectoras simples o compuestas basadas en etilenglicol sobre los embriones producidos *in vitro* (Experimento 1b).
- Evaluar la viabilidad de embriones producidos *in vitro* vitrificados en soluciones simples o compuestas basadas en etilenglicol (Experimento 1c).
- Evaluar el efecto de dos métodos de vitrificación en micro-volumen: micro pipetas de vidrio (GMP) y sobre superficie sólida de vitrificación (CVM), en la viabilidad de embriones producidos *in vitro* (Experimento 2).
- Comparar la supervivencia de los embriones producidos *in vivo e in vitro* criopreservados por el método de vitrificación con CVM o de congelamiento convencional (Experimento 3).
- Desarrollar un método de dilución dentro de la pajuela y evaluar el efecto de la dilución de las soluciones de vitrificación en medio holding o en una solución de sacarosa sobre la viabilidad de los embriones producidos *in vitro* vitrificados por el método de CVM (Experimento 4).

- Evaluar el efecto de la coloración Brillante cresyl blue en la selección de ovocitos y la presencia de ácido hialurónico en las soluciones de vitrificación, sobre la supervivencia de ovocitos bovinos maduros e inmaduros vitrificados por el sistema CVM (Experimento 5).

### MATERIALES Y METODOS

#### PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE EMBRIONES

Los embriones producidos *in vitro* para la realización de estos experimentos fueron obtenidos a partir de ovocitos provenientes de ovarios de frigorífico. Para esto, los ovarios fueron transportados hasta el laboratorio en un recipiente térmico conteniendo PBS modificado (PBSm), suplementado con 10% de SFB (Natocor, Argentina), a una temperatura entre los 23 a 30°C. Los complejos cúmulos-ovocitos (COCs) fueron recuperados por medio de la aspiración folicular de folículos con diámetros entre 3 a 8 mm, con una jeringa con aguja 16G, 3 a 5 horas después de la faena. Los COCs obtenidos fueron lavados y trasladados a un medio de manutención TCM-199 suplementado con 2,381 mM NaHCO<sub>3</sub> y 0,2mM piruvato de sodio, 50 µg de Gentamicina y 1 mg de BSA, para así ser evaluados y seleccionados según lo descrito por Hasler *et al.* (1995). Se consideraron como aptos solo los ovocitos con tres o más capas compactas de células del cúmulus, citoplasma homogéneo y aspecto esférico.

Para la obtención de embriones, los COCs frescos o vitrificados (según el experimento), fueron lavados en el medio TCM-199 y transferidos en grupos (30-50 COCs), a placas de cultivo de 4 pozos NUNC®, las cuales contenían 500µL de medio/pozo, para así ser madurados *in vitro* por un periodo entre 18 a 24 h a 38.8°C, bajo

atmosfera controlada y 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio utilizado para la maduración fue el medio TCM-199 (Sigma, USA), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (Natocor, Argentina), 0,2 mM de piruvato de sodio, 35 mg/ml de FSH porcina (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada), 15 mg/ml de LH (Lutropin; Bioniche Animal Health) y antibióticos. Posteriormente, los COCs fueron lavados y trasladados a un medio de fertilización FERT-TALP. Para la fertilización de los COCs fue usado semen convencional de toros con fertilidad comprobada. Una pajuela de 0,5mL de semen fue descongelada por rutina, a 37°C por 60 segundos en baño maría. Para su selección y capacitación fue utilizado un sistema de gradientes de partículas de silica (Isolate<sup>®</sup>, Irving Scientific). Una vez el semen era descongelado, era depositado en la parte superior de los gradientes y centrifugado a una velocidad de 2500 rpm por 15 min. El pellet resultado de esta centrifugación posteriormente era re diluido en 1 mL de medio de fertilización FERT-TALP y nuevamente centrifugado a 2500 rpm por 5 min, para retirar el polímero. Con este segundo pellet se realizaba el conteo de la concentración espermática final y se rediluía, para poder utilizar la muestra en una concentración final de  $1 \times 10^6$  de spz/mL, sobre cada gota de cultivo (500µL) que contenía los COCs (30-50 COCs/gota). Después de 20 h, los cigotos ya formados eran desnudados por medio de vortex, lavados y colocados en medio cultivo (SOFaa) en grupos de 20 ovocitos/gota, en gotas 500µl, cubierto por aceite mineral a 38,8°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub> y máximo de humedad. Los embriones fueron observados al día 2, y 7 para la determinación del porcentaje de clivaje y de producción blastocito posterior a la fertilización.

## EXPERIMENTO 1

La evaluación del efecto de las soluciones crioprotectoras en la viabilidad de los embriones, se realizó en varias etapas.

### *Experimento 1a*

Para poder evaluar la capacidad de vitrificación de las soluciones, se realizó diferentes asociaciones y concentraciones mínimas de los crioprotectores. Las soluciones de vitrificación utilizadas estuvieron compuestas por EG en diferentes porcentajes (10%, 20% ó 30%) como único crioprotector intracelular, en asociación con un crioprotector extracelular como la Trealosa (Tr) (0,5M; 0,75M ó 1 M), o en combinación con otro crioprotector intracelular como el PROH (10% o 20%; Tabla 2.1).

**Tabla 2.1.** Combinaciones de crioprotectores intra y extracelulares para la evaluación de la capacidad de inducción de estado vítreo

<b>Crioprotector Intracelular</b>	<b>Crioprotector Extracelular</b>
10% PROH + 10% EG	0,5M Trealosa
20% PROH + 20% EG	0,25M Trealosa
20% EG	0,5M Trealosa
20% EG	0,75M Trealosa
20% EG	1M Trealosa
30% EG	0,5M Trealosa
30% EG	0,75M Trealosa
30% EG	1M Trealosa

Todas las soluciones fueron diluidas en TCM-199 bufferado suplementado con 0,4% de BSA. Como solución control fue utilizado 20% EG + 20% PROH + 0,25 M de Trealosa diluida en el medio TCM-199 modificado.

La evaluación del estado vítreo de cada solución fue probada después de ser cargadas en pajuelas de 0,25 ml (150 $\mu$ L), en micro-pipetas de vidrio (5 $\mu$ L), para posteriormente, sumergirlas en el nitrógeno líquido o depositadas en gotas de 1 $\mu$ L sobre la superficie solida de vitrificación (CVM®, Cryologic) que estaba previamente enfriada a -196°C.

La visualización del estado vítreo, se hizo por medio de inspección directa según lo descrito previamente por Kasai *et al.* (1990) y Seki y Mazur (2009). Las soluciones que permanecieron transparentes estando sumergidas o expuestas al frio transmitido por el nitrógeno líquido fueron consideradas como soluciones con la capacidad de vitrificar y aquellas que presentan una apariencia opaca lechosa fueron consideradas como soluciones que no vitrifican (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** Izq. Solución cristalizada (lechosa), sin capacidad de formación de estado vítreo. Der. Solución con capacidad de formación de estado vítreo (transparente).

## *Experimento 1b*

Para la segunda parte de este experimento se utilizaron embriones bovinos producidos *in vitro* de ovarios de frigorífico según el protocolo descrito previamente, en 8 diferentes replicas. Para la evaluación de los niveles de toxicidad de las soluciones de vitrificación se utilizó un total de 253 embriones, en los estados de blastocisto grado 1. La clasificación y evaluación de la calidad de los embriones fue evaluada según los parámetros sugeridos por la IETS (Robertson y Nelson, 2011).

Los embriones fueron seleccionados y distribuidos en los tres diferentes grupos de tratamiento y un grupo control. De esta forma, los embriones fueron expuestos a las soluciones de equilibrio (SE) a 37°C por periodos de 1 ó 5 minutos, para posteriormente ser trasladados y expuestos en una solución final de vitrificación (SV) por 30 segundos. El grupo control fueron embriones sin ninguna exposición a las soluciones de vitrificación, que fueron seleccionados y colocados inmediatamente en cultivo.

La composición de las soluciones de vitrificación evaluadas fueron basadas a partir de Etilenglicol (EG), 1-2 Propanediol (PROH) y Trealosa (Tr), diluidas en medio buffer TCM-199, suplementado con 0,4% de BSA.

La solución de vitrificación 1, estaba compuesta por la solución de equilibrio **SE1:** 10% EG + 10% PROH, seguido de la solución de vitrificación **SV1:** 20% EG + 20% PROH + 0,25 M Tr. La solución de vitrificación 2, estaba compuesta por la solución **SE2:** 10% EG + 0,25 M Tr, seguido de la **SV2:** 20% EG + 1M Tr, y la solución de vitrificación

3, fue la compuesta por la **SE3**: 15% EG + 0,25 M Tr, seguido de la **SV3**: 30% EG + 0,75 M Tr.

Posteriormente, después de la exposición a los crioprotectores, los embriones fueron transferidos a un medio de dilución, compuesto por TCM-199 suplementado con 0,25 M de sacarosa por 5 minutos, lavados en medio Holding (Vigro Holding media®, Bioniche Animal Health), y finalmente transferidos a gotas de medio de cultivo SOF de 200 µL para su cultivo *in vitro*. Las tasas de re-expansión y de eclosión fueron evaluadas cada 24 horas por un periodo de 72 horas.

#### *Experimento 1c*

En la tercera parte de los experimentos se utilizaron embriones en el estadio de blastocito grado1, los cuales fueron producidos *in vitro* a partir de ovarios de frigorífico según el protocolo descrito previamente.

Los embriones (n= 320) seleccionados, fueron distribuidos de forma aleatoria en tres grupos experimentales y un grupo control. **Grupo control**: embriones que fueron mantenidos en medio SOFaa para ser cultivados sin sufrir ninguno tipo de tratamiento. **Grupo 1**: embriones expuestos a la solución de equilibrio **SE1** (10% EG + 10% PROH), durante 1 min, seguido de la exposición por 30 segundos en la solución de vitrificación **SV1** (20% EG + 20% PROH + 0,25 M Tr); **Grupo 2**: embriones expuestos a la solución **SE2** (10% EG + 0,25M Tr) por 1 min, seguido de **SV2** (20% EG + 1M Tr) por 30 segundos; y **Grupo 3**: embriones expuestos en la **SE3** (15% EG + 0,25M Tr) por 1 min,

seguido de la solución **SV3** (30% EG + 0,75M Tr) por 30 segundos. Todas las soluciones fueron diluidas en TCM-199 bufferado, suplementado con 0,4% de BSA.

Después de la exposición de los embriones a las soluciones crioprotectoras a 37°C, los embriones fueron envasados con el sistema de GMP, que es una modificación de la OPS. Las GMPs fueron hechas de micro-capilares de vidrio expuestos al calor y estirados manualmente hasta que su diámetro externo alcanzó aproximadamente los 0,6 mm.

Para la vitrificación, los embriones fueron envasados en las GMP por medio de capilaridad, al colocar la punta más fina de las micro-pipetas sobre las gotas de 2-4µL de solución de vitrificación final (SV), para así poder ser sumergidos directamente en el nitrógeno líquido (-196°C). Una vez vitrificados los embriones fueron almacenados en tanques de nitrógeno líquido por un periodo de mínimo una semana.

Para el proceso de descongelamiento de las muestras, la dilución de las soluciones crioprotectoras se realizó en gotas de 300 µL de TCM-199 suplementado con 0,25 M de sacarosa por un periodo de 5 minutos y posteriormente lavados en tres gotas de 50µL de medio de cultivo SOFaa. Finalmente, todos los grupos fueron trasladados a gotas de 200 µL de medio SOFaa suplementado con 0,4% of BSA, bajo aceite mineral, para ser cultivados a 38,8°C, bajo atmosfera controlada con 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> y 90% N<sub>2</sub> por un periodo de 72 horas. Las tasas de re-expansión y de eclosión fueron evaluadas cada 24 horas durante las 72 horas del cultivo.

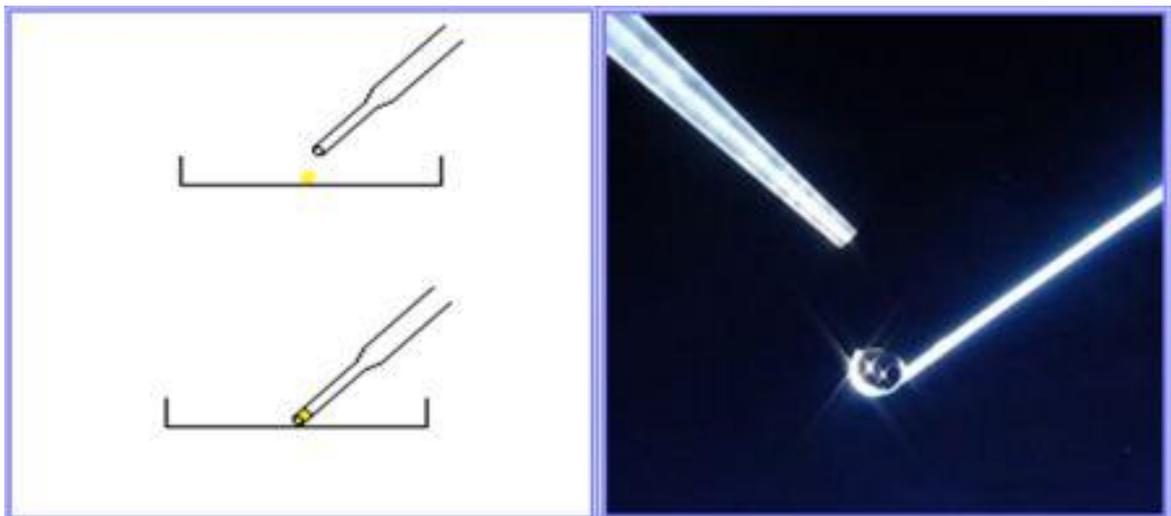
## EXPERIMENTO 2

Para este experimento se utilizaron blastocistos grado 1 (n=594), producidos *in vitro* según el protocolo del laboratorio descrito previamente. Los embriones seleccionados fueron distribuidos de forma aleatoria en 4 diferentes grupos experimentales, y un grupo control, en 10 diferentes replicas.

**Grupo control:** fueron los embriones transferidos en el medio de cultivo SOFaa inmediatamente después de la selección, sin ser expuestos a ningún tratamiento. **Grupo 1:** embriones expuestos a la solución de vitrificación 1 (**SV1**), compuesta por la solución de equilibrio, SE1: 10% EG + 10% PROH (1 min), seguido de la solución de vitrificación SV1: 20% EG + 20% PROH + 0,25 M Tr (30 seg), envasados en las GMP; **Grupo 2:** embriones expuestos a la solución de vitrificación **SV1**, envasados en los Fyberplugs, **Grupo 3:** embriones expuestos a la solución de vitrificación 3 (**SV3**), compuesta por SE3: 15% EG + 0,25 M Tr (1min), seguido de la SV3: 30% EG + 0,75 M Tr (30seg), y envasados en las GMP, **Grupo 4:** embriones expuestos a la solución de vitrificación **SV3**, envasados en los Fyberplugs.

La vitrificación de los embriones fue realizada través de la exposición de los embriones en las diferentes soluciones crioprotectoras, para poder ser envasados en los diferentes sistemas y ser almacenados en nitrógeno líquido. En el caso del sistema de envase GMP, se realizó de la misma forma que fue descrito en el experimento anterior, a través de capilaridad y la inmersión directa en el nitrógeno líquido (Figura 2.2). Por otro lado, los embriones envasados en los Fyberplugs, fueron envasados al depositar la gota

final de la solución de vitrificación que contiene el embrión (0,5-1 $\mu$ L), con una micro-pipeta visualizando bajo la lupa. Una vez depositados en el fyberplug, los embriones fueron vitrificados a través de sistema de vitrificación sobre superficie sólida, descrito por Dinnyes *et al.* (2000), en el sistema de vitrificación de Cryologic (CVM<sup>®</sup>, Cryologic, Australia). Para la generación del estado vítreo, los fyberplugs fueron colocados sobre una superficie metálica previamente enfriada a -196°C, para hacer contacto directo con toda la superficie de la gota (Figura 2.2). Subsecuentemente, los fyberplugs fueron cubiertos con una hemi-pajuela de plástico y almacenados dentro de nitrógeno líquido. Después de por lo menos una semana de almacenamiento en el nitrógeno líquido, los embriones en los diferentes grupos de tratamiento fueron descongelados en sacarosa 0,25M por 5 minutos y posteriormente lavados y transferidos en el medio de cultivo SOFaa. La evaluación de las tasas de re-expansión y eclosión de los embriones fue realizada cada 24 horas durante las 72 horas que permanecieron en cultivo.



**Figura 2.2.** Izq. Envasado por capilaridad en micro-pipetas de vidrio. Der. Envasado de microgota de vitrificación en Fyberplug.

### **EXPERIMENTO 3**

Para este experimento, los embriones producidos *in vitro* (n=445) fueron obtenidos al día 7 según el protocolo descrito previamente. Por su parte, la producción *in vivo* de embriones (n=220), se obtuvo a través de la colecta de vacas superestimuladas, de acuerdo con el protocolo descrito por Bó *et al.* (2008). Las vacas donadoras fueron artificialmente inseminadas 12 a 24 horas después de la administración de LH (Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Canada). El semen usado para la inseminación artificial fue el mismo que se utilizó para la FIV. Los embriones fueron colectados 7 días después a la LH, por medio del lavado de los cuernos uterinos con medio PBS (PICTOR-PBS, Biogen Argentina SA, Argentina). Del total de embriones colectados fueron solamente seleccionados para la criopreservación aquellos en estado de mórula y blastocisto grado 1 (Robertson y Nelson, 2011). Una vez seleccionados los embriones fueron distribuidos de forma aleatoria en los diferentes grupos experimentales.

La vitrificación de los embriones producidos *in vivo* e *in vitro* se realizó por medio del sistema de superficie solida descrito por Dinnyes *et al.* (2000), con modificaciones usando el sistema comercial CVM® (Cryologic, Australia), como se describió en el experimento 2.

Para la dilución de la solución crioprotectora durante el descongelamiento, los fiberplugs fueron destapados dentro del nitrógeno líquido, para liberar la presión de la hemi-pajuela y luego depositados en una solución de dilución de 0,25 M de sacarosa por 5

min a 37°C, lavados y colocados en medio de cultivo SOFaa, para la evaluación de la viabilidad de los embriones post-descongelado cada 24 horas por un periodo de 72 horas.

Por su parte, el procedimiento de congelamiento de los embriones *in vivo e in vitro*, se hizo con el método convencional, a través de la exposición de los embriones producidos *in vivo e in vitro* a una solución crioprotectora de 1,5 M de EG (Vigro Ethylene Glycol®, Bioniche Animal Health, Pullman, USA) por un periodo de 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los embriones fueron envasados en pajuelas plásticas de 0,25 mL, selladas y colocadas directamente en la congeladora Freeze Control 5500 (Cryologic®, Australia) a -6.5°C. Después de un periodo de adaptación de 2 a 3 minutos, se realizó la inducción de la cristalización (seeding), iniciándose la curva de congelamiento con un periodo de 10 min a -6.5°C, y una disminución progresiva de la temperatura de -0,6°C/min hasta los -35°C. Los embriones congelados fueron almacenados en nitrógeno líquido (-196°C) por lo menos por una semana. El descongelamiento de los embriones congelados, se hizo a través de un baño maría a 30°C por 30 segundos, y depositados en una placa de petri, para posteriormente ser lavados y colocados en medio de cultivo SOFaa, para así poder evaluar cada 24 horas por un periodo de 72 horas, la viabilidad de los embriones posterior al descongelamiento.

## **EXPERIMENTO 4**

Para este experimento fueron seleccionados blastocitos bovinos grado 1 producidos *in vitro* (n=572), según el protocolo descrito previamente. Los embriones seleccionados fueron distribuidos aleatoriamente en 4 diferentes grupos de tratamiento según la solución

de vitrificación y/o la solución de dilución usada durante el descongelamiento dentro de la pajuela y un grupo control, en 10 diferentes replicas.

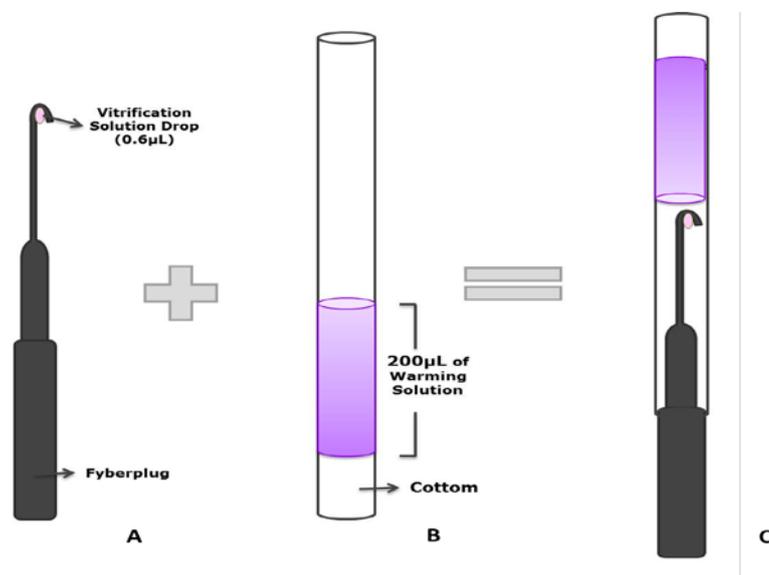
**Control:** embriones sin ningún tipo de tratamiento que fueron colocados directamente en medio de cultivo SOF después de ser seleccionados. **Grupo 1:** embriones expuestos a la solución de vitrificación **SV1** (EG+PROH), descrita en los experimentos anteriores, y diluidos durante el descongelamiento dentro de la pajuela en la solución de 0,25 M de sacarosa. **Grupo 2:** embriones vitrificados en **SV1** y diluidos durante el descongelamiento dentro de la pajuela en la solución de dilución Vigro<sup>®</sup> holding. **Grupo 3:** embriones expuestos a la solución de vitrificación **SV2** (EG), descrita en los experimentos anteriores, y diluidos en la solución de 0,25 M de sacarosa, **Grupo 4:** embriones vitrificados en **SV2** y diluidos la solución de dilución Vigro<sup>®</sup> holding.

El proceso de vitrificación de los embriones se realizó a través del sistema de superficie solida CVM<sup>®</sup>, como fue descrito en el experimento 2. Sin embargo, durante el proceso de sellado de los fiberplugs, en vez de ser depositados dentro de las hemipajuelas, fueron sellados con una pajuela plástica de 0,5 mL.

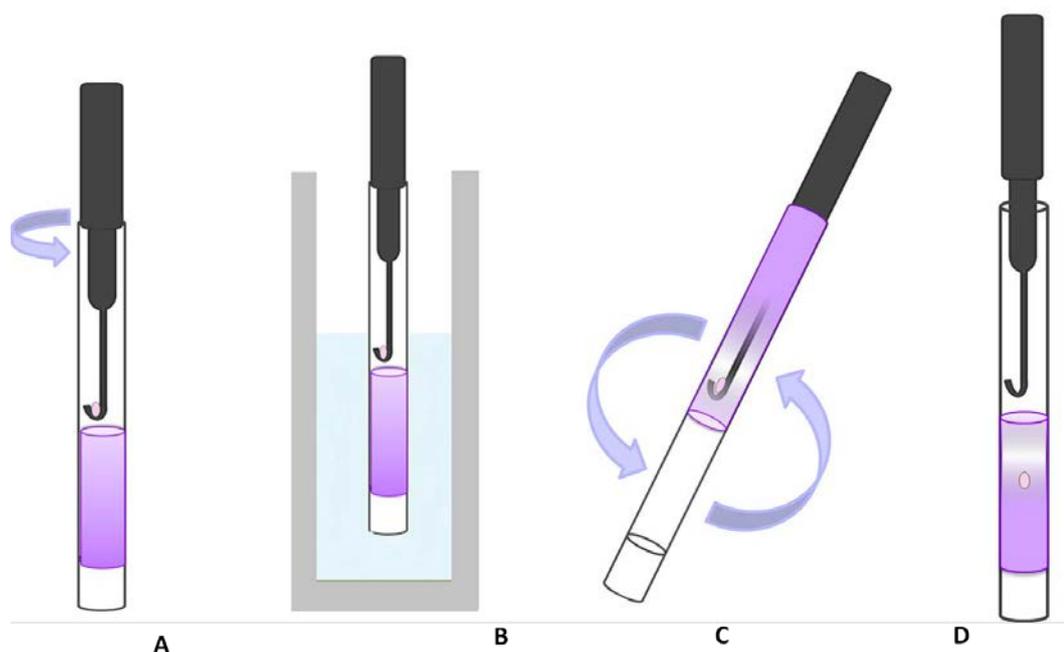
Para permitir la dilución de las soluciones crioprotectoras dentro de la pajuela (sacarosa ou Vigro<sup>®</sup> holding), estas pajuelas contenían 200µL de las soluciones de dilución en el extremo opuesto por donde se introduce el fiberplug. De esta forma, permitiendo el almacenamiento de las muestras, y evitando el contacto previo de la solución con la muestra vitrificada o la presencia de demasiado espacio de aire (Figura 2.3).

Después de por lo menos una semana de almacenamiento dentro de termos de nitrógeno líquido (-196°C), los embriones envasados en los fiberplugs fueron retirados de los termos dentro de una heladera con nitrógeno líquido para poder ser destapados aun dentro del nitrógeno líquido, para liberar la presión interna, antes de ser sometidos al descongelamiento. Posteriormente, las pajuelas selladas nuevamente fueron descongeladas en baño maría a 30°C por 30 segundos, y agitadas para la mezcla homogénea de las soluciones (Figura 2.4).

Luego de 1 minuto los embriones fueron lavados y transferidos en el medio de cultivo SOFaa, y mantenidos en cultivo, a una temperatura de 38.8°C, bajo atmosfera controlada de 5% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub>, por un periodo de 72 horas. La evaluación *in vitro* de las tasas de re-expansión y eclosión fue realizada cada 24 horas durante las 72 horas de cultivo.



**Figura 2.3** Dilución en la pajuela. (A) Fyberplug con la gota de vitrificación; (B) Pajuela plástica de 0,5ml con 200µL de las soluciones de dilución; (C) Fyberplug sellado con la pajuela.



**Figura 2.4.** Esquema de la dilución del sistema CVM dentro de la pajuela. (A) Se libera la presión girando el fiberplug dentro del nitrógeno líquido y se expone la pajuela al aire por 5 seg; (B) se sumerge en baño maría a (37°C) por 30 seg; (C) Se mezcla la solución de dilución dentro de la pajuela con la gota vitrificada; (D) Pajuela de 0,5 mL con el medio de dilución que contiene el embrión para la transferencia directa.

## EXPERIMENTO 5

Los ovocitos utilizados en este experimento fueron obtenidos de ovarios de frigorífico, los cuales fueron transportados en medio PBS entre 24 a 32°C hasta el laboratorio, en un periodo no mayor a 5 horas. Los complejos cumulus-ovocitos (COCs) fueron aspirados de folículos entre los 3–8 mm de diámetro, lavados en medio Vigro<sup>®</sup> Holding y seleccionados según sus características morfológicas, dejando como viables solo los ovocitos con citoplasma homogéneo, rodeados con varias células del cumulus compactas.

El total de los ovocitos que fueron seleccionados morfológicamente, pasaron por una segunda selección a partir de la coloración supravital de Brillante Cresyl Blue (BCB). Esta coloración selecciona los ovocitos, al determinar los niveles presentes en los COCs de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6DPH), según el protocolo descrito por Alm *et al.* (2005). Para ello, los COCs fueron depositados en gotas de 100µl de 26µM de BCB (Sigma, B-5388 St Louis, MO, USA) en PBS suplementado con 0,4% (w/v) BSA (Sigma A-9647 St Louis, MO, USA), incubados a 38.8°C, en atmosfera controlada con 5% CO<sub>2</sub>. Después de 90 minutos de incubación, los ovocitos fueron lavados en medio Vigro<sup>®</sup> holding, observados bajo estereomicroscopio y clasificados de acuerdo con la coloración en dos grupos, como BCB (+), los ovocitos con citoplasma azul (ovocitos maduros), y BCB(-) ovocitos con citoplasma sin ninguna coloración (ovocitos en crecimiento).

La vitrificación de los ovocitos, se realizó en dos ensayos diferentes. El experimento 5a se realizó en ovocitos inmaduros y el experimento 5b con ovocitos maduros. El protocolo de vitrificación para los dos experimentos fue una adaptación del protocolo descrito por Zhou *et al.* (2010), con modificaciones. Los ovocitos fueron vitrificados a través del sistema de superficie sólida de vitrificación CVM<sup>®</sup>, de la misma forma que fue descrito en los experimentos anteriores. Las soluciones de vitrificación usadas para los dos experimentos fueron: **SV1**: 10% EG diluido en medio TCM-199 suplementado con 0,4% de BSA por un periodo de 10 min, para la saturación inicial de los ovocitos (Papis *et al.*, 2000), seguido de una solución de 20% EG + 0,2M trealosa por 30 segundos, para finalmente depositarlos en una tercera solución de vitrificación compuesta por 30% EG + 0,5M trealosa por 30 segundos; **SV1+HA**: 10% EG por 10 min, seguido de 20% EG + 0,2M trealosa por 30 seg, similar a la primera solución, con la diferencia de la

adición de ácido hialurónico en la solución de vitrificación final de 30% EG+ 0,5M trealosa + 0,1g/ml de ácido hialurónico. Por lo tanto, el total de ovocitos seleccionados en cada grupo fue re dividido en 2 diferentes grupos según las soluciones de vitrificación, siendo 4 grupos experimentales y un grupo control.

**Grupo control:** ovocitos sin ningún tipo de tratamiento, que fueron colocados en cultivo inmediatamente después de que fueron seleccionados; **Grupo control vit:** ovocitos sin ningún tipo de tratamiento, sino simplemente vitrificados en la solución de vitrificación **SV1**; **Grupo 1:** ovocitos seleccionados como **BCB (+)** expuestos a la solución de vitrificación **SV1**; **Grupo 2:** ovocitos seleccionados como **BCB (+)** expuestos a la solución de vitrificación **SV1+HA**; **Grupo 3:** ovocitos seleccionados como **BCB (-)** expuestos a la solución de vitrificación **SV1**; **Grupo 2:** ovocitos seleccionados como **BCB (-)** expuestos a la solución de vitrificación **SV1+HA**.

En el experimento 5a, en el que se vitrificó ovocitos inmaduros (n=716), los COCs seleccionados fueron distribuidos aleatoriamente en los grupos y vitrificados, inmediatamente después del periodo de incubación en el BCB. Los ovocitos permanecieron almacenados por lo menos por una semana en nitrógeno líquido. Para la dilución de las soluciones crioprotectoras, los fiberplugs fueron retirados de los -196°C y colocados sobre una primera solución de 0,5 M de sacarosa por 5 min, seguida de una segunda solución de 0,25 M de sacarosa por otros 5 min, y del lavado en medio de maduración TCM-199, antes de ser colocados en cultivo (gotas de 500 µL). Los ovocitos fueron trasladados al medio de TCM-199 y madurados por 24 horas, para continuar bajo el mismo protocolo de producción *in vitro* de embriones usado en todos los experimentos.

Las tasas de producción embrionaria fueron evaluadas al día 2, para observar las tasas de clivaje y al día 7, para observar las tasas de blastocitos.

En el experimento 5b para la vitrificación de ovocitos maduros (n=592), posterior a la selección los COCs fueron lavados después de la selección y posteriormente ser trasladados en gotas de 500µL de medio de maduración TCM-199, por un periodo entre 20-24 horas. Transcurrido este periodo, los ovocitos fueron retirados, y por medio de un pipeteo suave retiradas parcialmente las células del cumulus, para facilitar el proceso de vitrificación. La división de los grupos de tratamiento, la vitrificación y la dilución, la maduración y el cultivo fueron realizadas como en el experimento 5a.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos de las mediciones de tasas de re-expansión y eclosión del experimento 3 fueron comparadas por el test de Chi-cuadrado, con un nivel de significancia de  $P < 0,05$ .

Los datos de porcentajes de re-expansión y de eclosión de los experimentos 1, 2, y 4, así como las tasas de clivaje y producción de embriones del experimento 5, al evaluar el efecto de diferentes factores, fueron transformados por la raíz cuadrada y posteriormente analizados por ANAVA. El test de diferencia mínima significativa (LSD) fue usado para las subsecuentes comparaciones múltiples con ANAVA, teniendo como diferencia significativa ( $P < 0,05$ ). El análisis estadístico de todos los experimentos del proyecto fue realizado utilizando el programa Infostat 1.0 (Infostat, Universidad Nacional de Córdoba, 2010).

### RESULTADOS

#### EXPERIMENTO 1

##### *Experimento 1a*

Los resultados demostraron que las soluciones en volúmenes menores a 1  $\mu\text{L}$ , aumentan las probabilidades de la formación de estado vítreo aun para el caso de soluciones compuestas con un solo crioprotector intracelular. Por otro lado, soluciones con 10% EG + 10% PROH, no presentaron la formación de estado vítreo en ningún tipo de volumen. Además, soluciones con concentraciones iguales o mayores a 20% de EG con concentración mayor de 0,75 M de trealosa de forma individual o compuesta con otros crioprotectores, presentaron formación de estado vítreo en cualquiera de los volúmenes (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1.** Ocurrencia del estado vítreo de diferentes soluciones durante la inmersión en nitrógeno líquido en diferentes envases.

Soluciones de vitrificación	Pajuela (0,25 ml)	GMP (2-5µL)	CVM (0,5-1µL)
10% EG +10% PROH + 0,5M Tr	-	-	-
10% EG + 20% PROH + 0,25M Tr	+	+	+
20% EG + 0,5M Tr	-	-	+
20% EG + 0,75M Tr	-	+	+
20% EG + 1M Tr	+	+	+
30% EG + 0,5M Tr	+	+	+
30%EG + 0,75M Tr	+	+	+
30% EG + 1M Tr	+	+	+

(-) No vitrifica, apariencia lechosa; (+) Vitrifica, apariencia transparente.

### *Experimento 1b*

Las tasas de viabilidad de los embriones *in vitro* expuestos a las soluciones crioprotectoras son los señalados en la Tabla 3.2. Las tasas de re-expansión no presentaron diferencias entre las soluciones cuando fueron expuestos por un periodo de 1 min. Sin embargo las tasas de eclosión fueron mayores ( $P < 0,05$ ) cuando los embriones fueron expuestos a la solución de vitrificación SE2+SV2, en comparación con la SE3+SV3 y no difirió con la SE1+SV1, ni con el grupo control. Para el periodo de exposición de 5 minutos, las tasas de re-expansión y de eclosión fueron mayores para la solución SE2+SV2, en comparación con las SE1+SV1 o SE3+SV3. Mientras que la tasa de eclosión

fue mayor ( $P < 0,05$ ) en los embriones vitrificados con la SE2+SV2 que en la solución SE3+SV3 y no difirió con la ES1+VS1, ni con la del grupo control.

**Tabla 3.2.** Tasas de re-expansión y eclosión posterior a la exposición en diferentes intervalos de tiempo en tres diferentes soluciones de vitrificación

Soluciones	Nº. de embriones re-expandidos / Nº embriones tratados (%)		No. de embriones eclosionados / Nº embriones tratados (%)	
	Tiempo de exposición de equilibrio		Tiempo de exposición de equilibrio	
	1 min	5 min	1 min	5 min
<b>SE1 + SV1</b>	82,0±4,3 <sup>a</sup>	61,8±5,9 <sup>b</sup>	43,1±3,7 <sup>b</sup>	38,9±3,0 <sup>b</sup>
<b>SE2 + SV2</b>	87,6±7,1 <sup>a</sup>	87,7±4,8 <sup>a</sup>	52,5±5,2 <sup>ab</sup>	52,0±4,2 <sup>ab</sup>
<b>SE3 + SV3</b>	76,5±6,2 <sup>a</sup>	65,6±7,0 <sup>b</sup>	31,6±5,4 <sup>c</sup>	20,6±3,7 <sup>c</sup>
<b>Control</b>	-		62,6±6,6 <sup>a</sup>	

**SE1**= 10% EG + 10% PROH (1min) seguido por **SV1**= 20% EG + 20% PROH+ 0,25MTr (30seg); **SE2**= 10% EG +0,25MTr (1min) seguido por **SV2**= 20% EG +1MTr (30seg); **SE3**= 15% EG + 0,25MTr (1min) seguido por **SV3**=30% EG + 0,75MTr (30seg).

<sup>a,b</sup> Tasas en la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente,  $P < 0,05$

### *Experimentos 1c*

Los resultados de la viabilidad de los embriones después de la vitrificación en las diferentes soluciones, están indicados en la Tabla 3.3. Las tasas de re-expansión de los embriones vitrificados en la solución SV3 fueron mayores ( $P < 0,05$ ) que para la solución SV1 y no difirió con la solución SV2. Las tasas de eclosión por su parte fueron mayores en el grupo control que en los grupos vitrificados ( $P < 0,05$ ). Las tasas de eclosión del grupo SV3 fueron mayores ( $P < 0,05$ ) que los grupos SV1 y SV2, y fueron mayores las tasas de los embriones en la solución SV2 ( $P < 0,05$ ) que las de los embriones en el grupo SV1.

**Tabla 3.3.** Tasas de re-expansión y eclosión de embriones vitrificados en diferentes soluciones de vitrificación

<b>Soluciones</b>	<b>No. Embriones</b>	<b>Embriones Re-expandidos (%)</b>	<b>Embriones Eclosionados (%)</b>
<b>SV1</b>	81	64,4±0,9 <sup>b</sup>	37,2±2,5 <sup>d</sup>
<b>SV2</b>	81	68,5±1,5 <sup>ab</sup>	49,6±1,0 <sup>c</sup>
<b>SV3</b>	82	72,2±1,9 <sup>a</sup>	58,2±0,8 <sup>b</sup>
<b>Control</b>	76	-	74,4±2,5 <sup>a</sup>

**SV1**= 10% EG + 10% PROH (1min) seguido por 20% EG + 20% PROH+ 0,5MTr (30seg); **SV2**= 10% EG +0,25MTr (1min) seguido por 20% EG +1MTr (30seg); **SV3**= 15% EG + 0,25MTr (1min) seguido por 30% EG + 0,75MTr (30seg).

<sup>a,b</sup> Tasas en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferente, P<0,05

## **EXPERIMENTO 2**

Las tasas de viabilidad de los embriones vitrificados posterior al descongelamiento demostraron no presentar interacciones entre los métodos de criopreservación y las soluciones de vitrificación. Al ser analizados por separado cada uno de los factores, se observó que no hubo diferencias entre los sistemas de criopreservación (P>0,1). Sin embargo, se observaron diferencias significativas entre las soluciones de vitrificación (P<0,05), al ser analizados por separado. Los embriones vitrificados en la solución simplificada de EG (SV3) presentaron tasas de re-expansión y de eclosión mayores (P<0,05) en comparación con los embriones vitrificados en las soluciones compuestas con EG + PROH (SV1), siendo similar a las observaciones hechas en el experimento anterior (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4.** Tasas de re-expansión y de eclosión de los embriones vitrificados con dos diferentes métodos de vitrificación

Metodos de Vitrificación	Soluciones de Vitrificación	No. Embriones	Embriones Re-expandidos (%)	Embriones Eclosionados (%)
<b>Control</b>		95	-	77,0 ± 1,3 <sup>a</sup>
<b>GMP</b>		250	67,8 ± 4,4	40,8 ± 3,4
<b>CVM</b>		249	69,0 ± 2,0	46,0 ± 1,3
	<b>SV1</b>	250	63,3 ± 3,3 <sup>b</sup>	39,7 ± 2,8 <sup>c</sup>
	<b>SV3</b>	249	73,5 ± 3,1 <sup>a</sup>	47,1 ± 2,1 <sup>b</sup>
<b>Interacción</b>				
<b>Metodos x Soluciones</b>				
<b>GMP</b>	<b>SV1</b>	126	61,2 ± 6,3	36,6 ± 5,4
	<b>SV3</b>	124	74,5 ± 5,7	45,0 ± 3,9
<b>CVM</b>	<b>SV1</b>	124	65,5 ± 2,6	42,8 ± 1,3
	<b>SV3</b>	125	72,6 ± 2,9	49,3 ± 1,9

**VS1**= 10% EG + 10% PROH (1min) seguidos por 20% EG + 20% PROH+ 0,5MTr (30seg); **VS3**= 15% EG + 0,25MTr (1min) seguido por 30% EG + 0,75MTr (30seg).

<sup>a,b</sup> Tasas en la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente, P<0,05

### EXPERIMENTO 3

Las tasas de re-expansión y eclosión de los embriones producidos *in vivo* fueron superiores en comparación que los producidos *in vitro* (P<0,01), sin importar el método de

criopreservación. Sin embargo, las tasas de viabilidad fueron mayores para los embriones *in vitro* vitrificados, que aquellos criopreservados por medio de la congelación convencional ( $P<0,01$ ). Para el caso de los embriones producidos *in vivo* la criopreservación por medio de los dos sistemas presentó tasas de re-expansión y de eclosión sin diferencias significativas. Solo hubo una tendencia ( $P=0,09$ ) a una mayor tasa de eclosión en los embriones congelados que con los vitrificados.

**Tabla 3.5.** Tasas de viabilidad de los embriones producidos *in vivo* e *in vitro* criopreservados por diferentes métodos.

<b>Producción Embriones</b>	<b>Sistema Criopreservación</b>	<b>Embriones (n)</b>	<b>Re-expansión n (%)</b>	<b>Eclosión n (%)</b>
<i>In vivo</i>	Congelamiento convencional	100	86 (86) <sup>c</sup>	81 (81) <sup>c</sup>
	Vitrificación	110	93 (85) <sup>c</sup>	78 (71) <sup>c</sup>
<i>In vitro</i>	Congelamiento convencional	222	89 (40) <sup>a</sup>	45 (20) <sup>a</sup>
	Vitrificación	223	155 (69) <sup>b</sup>	132 (59) <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Tasas con diferente superíndice difieren significativamente ( $P<0,05$ )

## **EXPERIMENTO 4**

La solución de vitrificación SV3 (179/235, 76% y 135/235, 57%), obtuvo tasas de re-expansión y eclosión mayores, que las de la SV1 (146/237, 61% y 88/237, 37%) ( $P<0,05$ ). Además, las tasas de re-expansión y de eclosión de los embriones vitrificados en soluciones SV3 y diluidos en 0,25 M de sacarosa fueron similares a los diluidos en

holding. Sin embargo, para el caso de los embriones vitrificados en la solución VS1 (EG + PROH), las tasas de re-expansión y de eclosión fueron mayores ( $P < 0,05$ ), para los diluidos en 0,25 M de sacarosa, que aquellos diluidos en holding (Tabla 3.6).

**Tabla 3.6.** Tasas de re-expansión y de eclosión de blastocistos diluidos en dos diferentes soluciones dentro de la pajuela.

<b>Soluciones</b>	<b>Soluciones</b>	<b>No.</b>	<b>Re-expansión</b>	<b>Eclosión</b>
<b>Vitrificación</b>	<b>Dilución</b>	<b>Embriones</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>SV1</b>	Sacarosa	120	$67,7 \pm 2,3^b$	$47,0 \pm 1,7^c$
	Holding	117	$54,5 \pm 1,0^c$	$27,7 \pm 3,1^d$
<b>SV3</b>	Sacarosa	117	$74,7 \pm 1,3^a$	$57,2 \pm 2,2^b$
	Holding	118	$77,3 \pm 1,4^a$	$58,0 \pm 2,5^b$
<b>Control</b>	-	100	-	$77,0 \pm 1,0 (77)^a$

**SV1**= 10% EG + 10% PROH (1min) seguido por 20% EG + 20% PROH+ 0,5MTr (30seg); **SV3**= 15% EG + 0,25MTr (1min) seguido por 30% EG + 0,75MTr (30seg).

<sup>a,b</sup> Tasas en la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente,  $P < 0,05$

## **EXPERIMENTO 5**

En los resultados de los experimentos 5a (ovocitos inmaduros) y 5b (ovocitos maduros) no hubo interacciones entre la selección de ovocitos por medio de la coloración de BCB y las soluciones de vitrificación.

En el experimento 5a, las tasas de clivaje y de producción de blastocitos de los ovocitos inmaduros vitrificados, fue significativamente mayor para los ovocitos seleccionados BCB+ que para los BCB (-) ( $P < 0,005$ ).

Además, los resultados de clivaje de los ovocitos inmaduros que no fueron pre-seleccionados con BCB y vitrificados (control vit), fueron intermediarios en comparación con los grupos BCB (+) y (-) (Tabla 3.7). Sin embargo, el porcentaje de blastocistos en el grupo control vit fue menor ( $P < 0,005$ ) que los BCB (+) y no difirió de los BCB (-).

**Tabla 3.7.** Tasas de clivaje y de producción de embriones de ovocitos inmaduras seleccionados por Brillante Cresyl Blue

<b>Selección BCB</b>	<b>No. Embriones</b>	<b>Clivaje % (n)</b>	<b>Blastocistos % (n)</b>
<b>BCB +</b>	248	49,6±2,9 (121) <sup>b</sup>	6,4±0,4 (16) <sup>b</sup>
<b>BCB -</b>	248	40,0±1,5 (100) <sup>c</sup>	1,6±0,6 (4) <sup>c</sup>
<b>Control vit</b>	100	44,0±4,5 (44) <sup>bc</sup>	3,0±2,0 (3) <sup>c</sup>
<b>Control</b>	120	63,8±3,2 (75) <sup>a</sup>	32,0±1,3 (39) <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Tasas con diferente superíndice difieren significativamente ( $P < 0,05$ )

En la tabla 3.8 se muestra la comparación entre las soluciones de vitrificación. No hubo diferencia en las tasas de clivaje y blastocistos producidos con ovocitos vitrificados en las soluciones de crioprotectoras con o sin la presencia de ácido hialurónico. Sin embargo, las tasas de desarrollo de los embriones en los grupos VS1, VS1+HA y el control vit

fueron menores que la de los embriones en el grupo control que no fueron vitrificados (P<0,001) (Table 3.8).

**Tabla 3.8.** Tasas de clivaje y porcentaje de blastocitos producidos de ovocitos inmaduros vitrificados en dos diferentes soluciones de vitrificación

<b>Solución</b>	<b>No.</b>	<b>Clivaje</b>	<b>Blastocitos</b>
<b>Vitrificación</b>	<b>Embriones</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>
<b>SV1</b>	248	43,0±2,9 (106) <sup>b</sup>	3,3±0,9 (8) <sup>b</sup>
<b>SV1+HA</b>	248	46,6±2,6 (115) <sup>b</sup>	4,7±0,9 (12) <sup>b</sup>
<b>Control vit</b>	100	44,0±4,5 (44) <sup>b</sup>	3,0±2,0 (3) <sup>b</sup>
<b>Control</b>	120	63,8±3,2 (75) <sup>a</sup>	32,0±1,3 (39) <sup>a</sup>

**SV1:** 10% EG (10 min), seguido de 20% EG + 0,2M trealosa (30 seg) y luego 30% EG + 0,5M trealosa (30 seg); **SV1+HA:** 10% EG (10 min), seguido de 20% EG + 0,2M trealosa (30 seg) y luego 30% EG + 0,5M trealosa + 0,1g/ml de ácido hialuronico (30 seg).

**Control vit:** vitrificados en SV1 sin ser expuestos a BCB

<sup>a,b.</sup> Tasas con diferente superíndice difieren significativamente (P<0,05)

En el experimento 5b, las tasas de clivaje y de producción de blastocitos fue mayor en los ovocitos BCB (+) que en los BCB (-). Así mismo, las tasas de clivaje y de blastocitos fueron menores para los embriones en el grupo control vit (no seleccionados en BCB) (P<0,05) en comparación con los seleccionados como BCB (+) y no difirió de los BCB (-) (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9.** Tasas de clivaje y de producción de embriones de ovocitos maduras seleccionados por Brillante Cresyl Blue

<b>Selección</b>	<b>No.</b>	<b>Clivaje</b>	<b>Blastocistos</b>
<b>BCB</b>	<b>Embriones</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>
<b>BCB +</b>	195	46,3±3,0 (90) <sup>b</sup>	4,6±0,9 (9) <sup>b</sup>
<b>BCB -</b>	197	30,3±3,1 (60) <sup>a</sup>	0,5±0,5 (1) <sup>a</sup>
<b>Control vit</b>	100	36,0±6,8 (36) <sup>a</sup>	1,0±1,0 (1) <sup>a</sup>
<b>Control</b>	100	62,0±4,0 (62) <sup>c</sup>	32,0±4,9 (32) <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Tasas con diferente superíndice difieren significativamente (P<0.05)

Por otro lado, las tasas de clivaje y blastocistos presentaron una tendencia a ser mayores para los ovocitos maduros vitrificados en las soluciones con presencia de ácido hialurónico (Tabla 3.10). Sin embargo, los resultados no fueron significativamente superiores entre la solución SV1+HA y las soluciones SV1 y el control vit (P=0,56). Además, las tasas de desarrollo de los embriones en los grupos SV1, SV1+HA y el control vit fueron menores que la de los embriones en el grupo control que no fueron vitrificados (P<0,005).

**Tabla 3.10.** Tasas de clivaje y porcentaje de blastocistos producidos de ovocitos maduros vitrificados en dos diferentes soluciones de vitrificación

<b>Selección</b>	<b>No.</b>	<b>Clivaje</b>	<b>Blastocistos</b>
<b>BCB</b>	<b>Embriones</b>	<b>% (n)</b>	<b>% (n)</b>
<b>SV1</b>	195	35,7±4,2 (70) <sup>b</sup>	2,1±0,8 (4) <sup>b</sup>
<b>SV1+HA</b>	197	40,9±3,7 (80) <sup>b</sup>	3,0±1,1 (6) <sup>b</sup>
<b>Control vit</b>	100	36,0±6,8 (36) <sup>b</sup>	1,0±1,0 (1) <sup>b</sup>
<b>Control</b>	100	62,0±4,0 (62) <sup>a</sup>	32,0±4,9 (32) <sup>a</sup>

**SV1:** 10% EG (10 min), seguido de 20% EG + 0,2M trealosa (30 seg) y luego 30% EG + 0,5M trealosa (30 seg); **SV1+HA:** 10% EG (10 min), seguido de 20% EG + 0,2M trealosa (30 seg) y luego 30% EG + 0,5M trealosa + 0,1g/ml de ácido hialuronico (30 seg).

**Control vit:** vitrificados en SV1 sin ser expuestos a BCB

<sup>a,b.</sup> Tasas con diferente superíndice difieren significativamente (P<0,05)

### DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis confirman la hipótesis que la utilización de soluciones crioprotectoras simples compuestas por etilenglicol y los métodos de vitrificación en micro-volumen como el de la superficie sólida, permiten la vitrificación de ovocitos y embriones producidos *in vitro*. Además, fue posible el desarrollo de un sistema simple de dilución simple para la transferencia directa de los embriones, llegando a ser un método factible para ser usado en campo. Además, que al simplificar la metodología, permitiría igualmente disminuir los errores de manipulación y la variación que existe durante el proceso de dilución.

La vitrificación es un proceso físico que tiene la capacidad de solidificar una solución a bajas temperaturas, no por la cristalización, sino por la extrema elevación de la viscosidad durante el enfriamiento (Rall y Fahy, 1985). Sin embargo, para alcanzar un estado vítreo estable con bajas concentraciones de crioprotectores es necesario la combinación de altas tasas de enfriamiento con la disminución del volumen de la solución de vitrificación (Yavin y Arav, 2007). Con el fin de evaluar, cuál sería la solución más apta, que cumpliera con las características de capacidad de formación de estado vítreo y baja toxicidad, se comenzó en el Experimento 1 por evaluar la capacidad de vitrificación de las soluciones compuestas por EG. Los resultados demostraron, que la asociación de crioprotectores como el EG + PROH aumentan la posibilidad de vitrificación, tal cual fue planteado por otros autores (Baudot *et al.*, 2000; Chian *et al.*, 2005; Vajta y Nagy, 2006;

Rodriguez Villamil *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar que el EG es uno de los crioprotectores más débiles en la formación de estado vítreo, si es utilizado en concentraciones mayores al 20% es suficiente para alcanzar el estado vítreo si se lo combina con crioprotectores extracelulares como la Trealosa (Kasai *et al.*, 1996; Saha *et al.*, 1996; Campos-chillón *et al.*, 2006).

De igual forma, se evaluaron los niveles tóxicos de las soluciones propuestas, ya que independiente de la capacidad de formación de estado vítreo, el nivel de toxicidad de las soluciones es propio de cada combinación, y es otro de los factores que influye directamente en la viabilidad de las células vitrificadas. Se utilizó el EG como principal crioprotector de las soluciones ya que es uno de los crioprotectores intracelulares con menor toxicidad (Massip, 2001; Dochi *et al.*, 2006) y el principal componente de la mayoría de las soluciones de criopreservación (Saha *et al.*, 1996; Vajta *et al.* 1998; Kasai 2002; Campos-chillon *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2007). Al evaluar las tasas de supervivencia (re-expansión y eclosión), después de exponer los embriones en diferentes intervalos de tiempo a las soluciones de vitrificación simples de EG o compuestas de EG y PROH, no se observaron diferencias significativas entre las soluciones cuando fueron expuestos los embriones por 1 min. Sin embargo, las tasas de eclosión fueron mayores cuando los embriones fueron expuestos a las soluciones simples con EG que con las compuestas por un periodo de 5 minutos. Estos hallazgos confirmaron no solo la baja toxicidad específica del EG, sino también que la toxicidad de la combinación de dos crioprotectores no es aditiva sino sinérgica (Lawson *et al.*, 2011). Razón por la cual, es menos toxica la combinación del EG con un crioprotector extracelular como la trealosa que con el PROH (Saha *et al.*, 1996; Kasai *et al.*, 1996; Kuleshova *et al.*, 1999; Campos-

chillon *et al.*, 2006; 2009; Taniguchi *et al.*, 2007; Lawson *et al.*, 2011). La adición de otro crioprotector intracelular permite la disminución de la toxicidad de la solución, sin embargo la reducción de la concentración es más fácil de ser alcanzada a través del uso de crioprotectores no permeables, ya que permanecen en el espacio extracelular, ayudan a disminuir los daños osmóticos y reducen la formación de hielo intracelular en las células (Liebermann *et al.*, 2003; Fuller y Paynter 2004; Kasai y Mukaida, 2004). Por otra parte, estos resultados igualmente confirman que la reducción de los tiempos de exposición también disminuyen los niveles de toxicidad de los crioprotectores (Kasai y Mukaida, 2004; Rodriguez Villamil *et al.*, 2011).

Las tasas de supervivencia de los embriones después de ser vitrificados evaluadas en el Experimento 1c, presentaron resultados diferentes al del Experimento 1b donde se evaluó solo la toxicidad. A pesar de que se mantuvieron las diferencias significativas entre las soluciones simples con EG y las compuestas con EG y PROH, las tasas de eclosión de los embriones vitrificados en las soluciones con 20% de EG (49%) fueron menores que en las soluciones con 30% de EG (59%). Confirmando, que es precisamente la combinación de niveles de toxicidad bajos, la formación de un estado vítreo estable y la baja formación de hielo intracelular la clave para mejorar las tasas de supervivencia de los embriones durante el proceso de vitrificación/dilución (Liebermann, 2012). Por lo tanto, independientemente de que la trealosa tenga la capacidad de aumentar el estado vítreo de un crioprotector formador de vidrio débil como el etilenglicol y reduzca el estrés osmótico en el embrión (Liebermann *et al.*, 2003), el uso de porcentajes de EG menores al 30%, como único crioprotector permeable resulta en una menor viabilidad post vitrificación

porque es posible que la solución sea más inestable durante la dilución, aumentando las posibilidades de formación intracelular de cristales tal cual lo plantea Mazur *et al.* (2007). En el experimento 2, una vez seleccionadas las soluciones más óptimas para vitrificar, se evaluó el efecto de los envases y las técnicas de vitrificación en las tasas de supervivencia embrionaria. Como ya habíamos mencionado la tasas de enfriamiento son otro punto clave en el aumento de la probabilidad de estado vítreo (Yavin *et al.*, 2009) y esta influenciada por la conductividad térmica de los contenedores y el volumen relativo de la solución que rodea al embrión que está directamente influenciada (Bunn *et al.*, 2006; He *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010). Por otro lado, partiendo del hecho que la disminución de las tasas de enfriamiento se ven directamente influenciadas con la disminución del tamaño de las muestras y la modificación de los envases, decidimos analizar el efecto de los envases y de los sistemas de criopreservación sobre la viabilidad de los embriones con las dos mejores soluciones obtenidas en los dos primeros experimentos.

En los últimos años, varios envases han sido utilizados para alcanzar tasas de enfriamiento más rápidas durante la vitrificación como, las OPS, hemi-pajuelas, tips de gel, plástico de diámetro fino, cryotop, etc (Vajta *et al.*, 1998; Lane *et al.*, 1999; Vanderzwalmen *et al.*, 2000; Tominaga y Hanada, 2001, Cremades *et al.*, 2004; Kuwayama, 2007), llegando a elevar las tasas de congelamiento hasta 20,000°C/min. Sin embargo, es más fácil alcanzar dichas tasas usando contenedores con una mayor capacidad de transferencia de calor como el vidrio o el cuarzo (Cho *et al.*, 2002; Risco *et al.*, 2007), o por medio de sistemas que no usen envases (Lane *et al.*, 1999; Dinnyes *et al.*, 2000), permitiendo el aumento de las tasas de supervivencia de los embriones vitrificados (Cho *et al.*, 2002; Lindemans *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2010). Si bien no hubo diferencias

significativas en las tasas de eclosión de los embriones vitrificados en las micro-pipetas de vidrio GMP (40,8%) o el sistema CVM (Fyberplug; 46.0%) hubo una tendencia a una mayor tasa de eclosión de los embriones congelados por el sistema CVM sugiriendo que este sistema puede ser superior. Una probable causa de esta tendencia, sea que las tasas de conductividad del sistema CVM (10 W/mk) son mayores que las de las GMP (0,8 W/mk) permitiendo una vitrificación mas rápida. Además, debido a que la gota de vitrificación en el sistema CVM puede ser controlada a través de una micro-pipeta (0,6  $\mu$ L), y en las GMP al ser envases hechos a mano, los volúmenes envasados no son controlados ( $\approx$ 2  $\mu$ L), las tasas de supervivencia embrionaria fue más variable en los embriones vitrificados con las GMP (rango 13% a 64% de eclosión) que las vitrificadas con el sistema CVM (rango 37% a 50%) (Tabla 3.4).

Otra de las ventajas del sistema CVM es que al ser un sistema cerrado, no tiene contacto directo con el nitrógeno líquido durante ninguna parte del proceso, lo que disminuye el riesgo de contaminación con agentes bacterianos y/o virales durante la vitrificación y el almacenamiento (Bielansky y Lalonde, 2009; Beebe *et al.*, 2011).

Una vez comprobada la eficiencia de los sistemas de vitrificación y de las soluciones crioprotectoras se decidió analizar en el Experimento 3, si el comportamiento de los embriones producidos *in vivo e in vitro* es similar al ser utilizado el mismo sistema de vitrificación. Al comparar las tasas de supervivencia de los embriones *in vitro e in vivo* al ser criopreservados por medio de los métodos de vitrificación o de congelamiento convencional se observaron diferencias significativas entre los diferentes tipos de embriones, así como de entre las técnicas de criopreservación. Las tasas de supervivencia

de los embriones producidos *in vitro* fue menor que la de los embriones producidos *in vivo*, sin importar la técnica de criopreservación, confirmando los resultados reportados por otros autores (Sommerfield y Niemman 1999; Kaidi *et al.*, 2001; Seidel, 2006). Las diferencias entre los tipos de embriones a nivel morfológico (Abe y Hochi, 2003), ultraestructural (Fair *et al.*, 2001), metabólico (Khurana y Niemman, 2000) y genómico (Rizos *et al.*, 2002; 2003), se refleja en un daño celular y disturbios metabólicos mayores para los embriones *in vitro* cuando son sometidos a procedimientos de criopreservación que para los producidos *in vivo* (Rizos *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2010). Las células generalmente sufren un estrés durante la criopreservación, sin embargo los embriones producidos *in vitro* tienen un estrés osmótico mayor comparado con los embriones *in vivo* debido a los altos porcentajes de lípidos que tienen en la membrana y la poca flexibilidad, que hace que sean menos tolerantes a las bajas temperaturas (Seidel, 2006).

A su vez, las tasas de supervivencia de los embriones producidos *in vitro* fueron mayores para los embriones criopreservados por el método de vitrificación que por el método de congelación lenta (59% vs 20%), lo que es consistente con los resultados reportados por otros autores (Kaidi *et al.*, 2001; Nedambale *et al.*, 2004; Peachey *et al.*, 2005; Mucci *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010). Las características estructurales tales como; los blastómeros que parecen hinchados (Van Soom *et al.*, 1992), una zona pelúcida frágil (ZP) (Duby *et al.*, 1997) y como fue mencionado anteriormente, el alto contenido de los lípidos intracitoplasmáticos (Abe *et al.*, 2004; Barcelo-Fimbres y Seidel, 2011), en los embriones producidos *in vitro* hacen que sean más sensibles que los producidos *in vivo* cuando son criopreservados por medio del procedimiento de congelamiento convencional (Kaidi *et al.*, 2001; Assumpção *et al.*, 2008; Dinnyes y Nedambale, 2009; Nicacio *et al.*,

2011). Las gotas lipídicas tienen una estrecha relación con la maduración mitocondrial (Gomez *et al.*, 2008). Es por esta razón que cuando la criopreservación afecta los lípidos, la estructura mitocondrial es probablemente alterada, y el desarrollo de los embriones disminuido (Gomez *et al.*, 2008). El procedimiento de congelamiento convencional puede ser altamente perjudicial para las células con alto contenido lipídico, al involucrar tiempos de exposición prolongados en las temperaturas en las que más ocurren los daños (15°C a 0°C). El uso de tasas de congelamiento más rápidas en los procedimientos de vitrificación beneficia a los embriones y ovocitos, al proporcionar un tránsito más rápido a través de esta zona de temperatura (Visintin *et al.*, 2002). Además, la vitrificación previene los daños mecánicos (He *et al.*, 2008; Yavin *et al.*, 2009) causados por la formación de hielo intracelular (Bagis y Odoman 2005). Otros han demostrado que el desplazamiento de los lípidos intracelulares por medio de la centrifugación, la reducción del contenido lipídico en el citoplasma de los embriones con fenazina etosulfato y el cultivo *in vitro* en medios libres de suero, mejoran significativamente las tasas de supervivencia de los embriones *in vitro* a la criopreservación (Abe y Hochi, 2003; Abe *et al.*, 2004; Mucci *et al.*, 2006; Seidel, 2006; Pryor *et al.*, 2007).

Finalmente, a pesar de que las tasas de expansión de los embriones *in vivo* fueron similares entre los vitrificados y los congelados se presentó una tendencia a una menor tasa de eclosión en los embriones vitrificados en comparación con aquellos que fueron congelados. Este hallazgo es difícil de interpretar ya que otros estudios han observado que la vitrificación es un método apto para la criopreservación de embriones producidos *in vivo*, con tasas similares de supervivencia a las de congelamiento convencional (Van Wagendonk-de Leeuw *et al.*, 1997; Campos-chillon *et al.*, 2006; Pryor *et al.*, 2007; Yu *et*

*al.*, 2010). Por lo tanto, la tendencia a tasas de eclosión diferentes observadas en este estudio justifica investigaciones futuras, mediante la evaluación de las tasas de preñez en receptoras.

Ante la necesidad de optimizar el sistema de vitrificación para la transferencia directa de los embriones, se decidió estudiar en el Experimento 4 el sistema de dilución en pajuela para el método CVM.

Para evitar la toxicidad y los daños osmóticos producidos por los crioprotectores durante la dilución, es necesario que los crioprotectores intracelulares sean removidos de forma rápida y proporcional a la entrada de agua, para prevenir el sobre hinchamiento y daño celular (Liebermann *et al.*, 2003; El-Gayar *et al.*, 2008). Rutinariamente los protocolos de descongelamiento de los embriones vitrificados, usa la dilución con concentraciones decrecientes de sacarosa para balancear el hinchamiento causado por la salida relativamente lenta del crioprotector permeable de la célula (Ishimori *et al.*, 1993; Saha *et al.*, 1996; Kasai y Mukaida, 2004; Guignot *et al.*, 2006). Los resultados de este experimento confirmaron la importancia del uso de sacarosa para la dilución y salida de los crioprotectores intracelulares, cuando los embriones fueron vitrificados en las soluciones compuestas por EG-PROH, al obtener tasas de eclosión mayores cuando los embriones vitrificados fueron diluidos en sacarosa que en el medio holding. Sin embargo, cuando los embriones fueron vitrificados en las soluciones simples con EG, no hubo diferencias entre el uso de sacarosa o medio holding como solución de dilución, similar a las observaciones hechas por otros autores (Saha *et al.*, 1996; Campos-Chillón *et al.*, 2006), que sugirieron igualmente que el uso o no de sacarosa durante el proceso de dilución es irrelevante

cuando las soluciones tienen como único crioprotector intracelular el EG. Las mejores tasas de eclosión de los embriones vitrificados en las soluciones compuestas por EG-PROH cuando fueron diluidos en sacarosa es debido, a que las altas concentraciones de los crioprotectores tienen un flujo de salida lento de la célula hasta que las condiciones iso-osmóticas se restauran. Por lo tanto necesitan de una solución hipertónica para aumentar el flujo neto de salida de los crioprotectores. En cambio, las soluciones que utilizan solo EG, tienen una rápida salida de las células embrionarias, lo que permite que puedan ser colocadas directamente en soluciones isotónicas o en las receptoras (Massip, 2001). Resultados similares también fueron mostrados en estudios previos (Pugh *et al.*, 2000; Taniguchi *et al.*, 2007), en los cuales se observó que los embriones vitrificados diluidos dentro de la pajuela tuvieron tasas de supervivencia mayores, cuando fueron criopreservados en soluciones simplificadas con uno que con dos crioprotectores intracelulares.

Por otro lado, la evaluación *in vitro* del sistema de dilución dentro de la pajuela demostró que es un método factible para la transferencia directa, ya que reduce la posibilidad de errores en la manipulación y la variación de técnicas durante el proceso de dilución. Otros estudios han demostrado tasas de eclosión similares usando la dilución dentro de la pajuela con envases de micro-volumen como OPS, GMP o Cryotop (Vajta *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2007; Inaba *et al.*, 2011). Sin embargo, estos dispositivos tienen protocolos muy complicados para la dilución de los embriones vitrificados, por lo que es necesario para diluir la gota de vitrificación, introducir los envases dentro de una pajuela plástica de transferencia de 0,25mL que contienen las soluciones de dilución. Esto hace que el operador tenga que manipular aún más el embrión durante el descongelamiento,

teniendo además variaciones de temperatura que pueden afectar la viabilidad, y el tiempo necesario para transferir, disminuyendo las tasas de supervivencia, si los sistemas son usados a nivel de campo sin laboratorio al lado de la manga. Los resultados en este estudio demostraron, que estos protocolos simplificados de descongelamiento y de dilución dentro de la pajuela de embriones vitrificados por el método CVM, ofrecen la posibilidad de llevar a cabo la transferencia de embriones a campo. Sin embargo, será necesario hacer experimentos a futuro que confirme estos resultados por medio de la transferencia de embriones en receptoras.

Por último, en cuanto a la vitrificación de ovocitos, la proporción de ovocitos vitrificados que desarrollan en blastocitos es bastante baja. Para obtener resultados satisfactorios es importante tener ovocitos de buena calidad y competentes (Sirard *et al.*, 2006). Sin embargo, solo un porcentaje del total de ovocitos recuperados podrá ser usado. La evaluación morfológica ha demostrado su eficiencia en la selección de ovocitos de “buena” calidad, comprobando la correlación de la integridad del citoplasma y de las células del cumulus con la competencia del ovocito y la tasa de producción de blastocistos (Hawk *et al.*, 1994; Fair, 2003; Merton *et al.*, 2003). No obstante, la coloración con Brillante Cresyl Blue es una opción para mejorar la selección de los ovocitos inmaduros por medio de la actividad de la enzima G6DPH (Rodriguez-gonzalez *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2004; Alm *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007; Opiela *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). Los resultados del Experimento 5 demostraron que cuando los ovocitos fueron seleccionados como BCB (+) las tasas de supervivencia fueron mejores que los BCB (-). Además, esta observación también se presentó cuando los ovocitos vitrificados seleccionados como BCB+ fueron comparados con el grupo control de vitrificación que no

fueron seleccionados por BCB, lo que confirmó la observación hecha por otros autores previamente, que la tinción con BCB tiene la capacidad de reconocer los ovocitos con alta competencia de desarrollo (Rodríguez-González *et al.*, 2003; Alm *et al.*, 2005; Manjunatha *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Ishizaki *et al.*, 2009; Heleil *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). Por otro lado, los mayores porcentajes de producción de blastocistos de ovocitos seleccionados como BCB (+) confirma la observación hecha por Hadi *et al.* (2010), en el cual los ovocitos inmaduros seleccionados como BCB (+) obtuvieron tasas de desarrollo mayores después de ser vitrificados, al alcanzar porcentajes mayores de ovocitos en estadio MII que los obtenidos por el grupo control de vitrificación.

En cuanto a la vitrificación, existen varios reportes acerca de las diferencias en las tasas de supervivencia después de la descongelamiento de los ovocitos maduros de los inmaduros. Algunos autores observaron que los ovocitos inmaduros son más sensibles a la criopreservación debido a la poca estabilidad de la membrana y la susceptibilidad del citoesqueleto (Ambrosini *et al.*, 2006) sin embargo otros han observado el aumento de anomalías cromosomales, alteración en la distribución de granulo corticales y alteraciones en el huso meiotico en los ovocitos maduros (Hyttel *et al.*, 2000, Shaw *et al.*, 2000, Morato *et al.*, 2008). Sin embargo, todos estos reportes son variables y hasta contradictorios, debido a las diferencias que existen entre los protocolos y procedimientos entre laboratorios. Los resultados de esta tesis indicaron que los ovocitos maduros son más susceptibles a la vitrificación, al presentar tasas de desarrollo menores después de ser diluidos que los ovocitos inmaduros, siendo similar a lo observado por otros autores (Magnusson *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2010). Estos resultados se dieron probablemente debido a que la expansión de las células del cumulus lleva a un incremento del área y

volumen y de los cambios de permeabilidad, que se ha visto hacen que sean más sensibles (Agca *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2010).

Además, el efecto de las soluciones de vitrificación también obtuvo tasas de desarrollo similares para los ovocitos maduros e inmaduros. Las tasas de clivaje y producción de blastocitos vitrificados en las soluciones de vitrificación suplementados con ácido hialurónico (SV1+HA) presentaron solo una tendencia a mejorar comparados con los vitrificados sin la presencia de ácido hialurónico (SV1). Otros estudios demostraron la eficacia del ácido hialurónico en el aumento de las tasas de supervivencia de embriones después de la vitrificación, pero estos estudios usaron el ácido hialurónico en los medios de cultivo (Stojovic *et al.*, 2002; Block *et al.*, 2009; Palasz *et al.*, 2008, 2009) o durante el proceso de deshidratación previo a la criopreservación (Sheehan *et al.*, 2007), lo que sugiere que el uso de ácido hialurónico puede ser más efectivo si es usado durante un proceso de pre-incubación previo a la criopreservación que dentro de la solución como tal. Además, Palasz *et al.*, (2000) demostraron la eficacia del hialuronato sódico (SH) dentro de las soluciones de congelamiento. Sin embargo, estos resultados igualmente demostraron que este beneficio proporcionado por el SH dentro de la solución de criopreservación es similar al proporcionado por otras macromoléculas como BSA o los surfactantes de transferencia de embriones.

### CONCLUSIONES

Los resultados de esta tesis confirman la hipótesis propuesta. La vitrificación en micro-volumen utilizando soluciones simples de etilenglicol proporciona la supervivencia embrionaria de ovocitos inmaduros y embriones producidos *in vitro* y permiten la utilización de sistemas simples de dilución para la transferencia directa de los embriones.

Las conclusiones específicas de esta tesis son:

- Soluciones de vitrificación simples compuestas por EG como único crioprotector intracelular en porcentajes de concentración al 30%, tienen alta capacidad de generar estado vítreo, así como las soluciones compuestas de EG en combinación con otros crioprotectores.
- Las tasas de viabilidad de los embriones expuestos a las soluciones crioprotectoras simples o compuestas fueron similares cuando fueron expuestos por cortos periodos de tiempo (1 min).
- A pesar que la solución de 20% EG presento los menores niveles de toxicidad, frente al 30% EG o al 20% EG+20% PROH, las tasas de viabilidad posteriores a la vitrificación fueron mayores en la solución de 30% de EG, que para las solución compuesta EG-PROH o la solución con 20% EG

- No hubo diferencia entre los dos sistemas de vitrificación que utilizan envase de micro-volumen evaluados GMP ó el sistema de la superficie solida CVM.
- Las tasas de viabilidad de embriones vitrificados en una solución de EG al 30%, fueron similares posterior al descongelamiento al ser diluidos dentro de la pajuela, tanto en medio holding o en sacarosa.
- El sistema CVM puede ser usado como técnica de criopreservación de los embriones producidos tanto *in vitro* como *in vivo*
- El sistema CVM mejoro las tasas de viabilidad post-descongelado de los embriones *in vitro* en comparación con el congelamiento convencional
- Los ovocitos maduros e inmaduros seleccionados por medio de la tinción de BCB tienen mayores tasas de desarrollo que los ovocitos BCB negativos y que los no seleccionados con BCB.
- El uso de ácido hialuronico en las soluciones de vitrificación de ovocitos no mejoro las tasas de desarrollo embrionario.

### BIBLIOGRAFÍA

- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev.* 61: 57-66.
- Abe H, Hochi H. 2003. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J Reprod Dev.* 49: 193-202.
- Abe H, Shiku H, Aoyagi S, Hochi H. 2004. *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. *J Mamm Ova Res.* 21: 22-33.
- Abe Y, Hara K, Matsumoto H, Kobayashi J, Sasada H, Ekwall H, Martinez HR, Sato E. 2005. Feasibility on a nylon mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol Reprod.* 72: 1416–1420.
- Adamiak SJ, Mackie K, Watt RG, Webb R and Sinclair KD. 2005. Impact of nutrition on oocyte quality: Cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol. Reprod.* 73: 918-926.
- Agca Y, Monson R, Northey D, Schaefer D, Rutledge J. 1996. Postthaw pregnancy rates comparison of vitrified and frozen *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology.* 45: 175.
- Agca Y, Liu J, Peter AT, Critser ES, Critser JK. 1998. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. *Mol. Reprod. Dev.* 49: 408–415.

- Albarracin JL, Morato R, Izquierdo D, Mogas T. 2005. Vitrification of calf oocytes: effects of maturation stage and prematuration treatment on the nuclear and cytoskeletal components of oocyte and their subsequent development. *Mol. Reprod. Dev.* 72, 239–249.
- Alm H, Torner H, Löhcke B, Viergutz T, Ghoneim IM, Kanitz W. 2005. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology*. 63: 2194 –205.
- Alvarenga MA, Fernandes CB, Landim-Alvarenga FC. 2007. Criopreservation of equine embryos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35: 799-809.
- Alvarez JG, Storey BT. 1993. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl.* 14:232–41
- Ambrosini G, Andrisani A, Porcu E, Rebellato E, Revelli A, Caserta D, Cosmia E, Marci R, Moscarini M. 2006. Oocytes cryopreservation: State of art. *Reproductive Toxicology*. 22: 250–262.
- Antosik P, Kempisty B, Bukowska D, Jackowska M, Włodarczyk R, Budna J, Brussow KP, Lianeri M, Jagodzinski PP, Jaskowski JM. 2009. Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of puberal gilts. *Journal of reproduction and development*. 55: 588-593.
- Arav A. 1992. Vitrification of oocytes and embryos. *In: Lauria A., Gandolfi, F., Embryonic Development and Manipulation in Animal Production*. Portland Press, London and Chapel Hill. 22: 255–264.

- Arav A, Zeron Y. 1997. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology* 47: 341.
- Assumpção MEOA, Milazzotto MP, Simões R, Nicacio AC, Mendes CM, Mello MRB, Visintin JA, 2008. *In vitro* survival of *in vitro*-produced bovine embryos cryopreserved by slow freezing, fast freezing and vitrification. *Animal Reproduction*. 5: 116-120.
- Bagis H, Odoman H. 2005. Effect of three different cryoprotectant solutions in solid surface vitrification (SSV) techniques on the development rate of vitrified pronuclear stage mouse embryos. *Turk J Vet Anim Sci*. 29: 621-627.
- Ballard CB, Looney CR, Lindsey BR, Pryor JH, Lynn JW, Bondioli KR, Godke RA. 2006. Using a buoyant density gradient and Nile red staining to evaluate the lipid content of *Bos taurus* and *Bos indicus* oocytes. *Reprod. fertil. dev.* 19: 170–171.
- Barcelo-Fimbres M, Seidel GE. 2011. Cross-validation of techniques for measuring lipid content of bovine oocytes and blastocysts. *Theriogenology*. 75: 434-444.
- Baudot A, Alger L, Boutron P. 2000. Glass-Forming tendency in the system water–dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*. 40: 151-158.
- Beebe LFS, Bouwmana EG, McIlfatrick SM, Nottle MB. 2011. Piglets produced from *in vivo* blastocysts vitrified using the Cryologic Vitrification Method (solid surface vitrification) and a sealed storage container. *Theriogenology*. 75: 1453-1458.
- Berlinguer F, Succu S, Mossa F, Madeddu M, Bebbere D, Leoni GG, Naitana S. 2007. Effects of trehalose co-incubation on *in vitro* matured prepubertal ovine oocyte vitrification. *Cryobiology*. 55: 27–34.

- Bielanski A, Lalonde A. 2009. Effect of cryopreservation by slow cooling and vitrification on viral contamination of IVF embryos experimentally exposed to bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1. *Theriogenology*. 72: 919–925.
- Block J, Bonilla L, Hansen PJ. 2009. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos *in vitro* following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology*. 71:1063-1071.
- Bó GA, Carballo Guerrero D, Adams GP. 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*: 69: 81–87.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*. 27: 147-158.
- Bunn S, Bertolini M, Cruz FB, Martins LT, Gaudencio NS, Wentz KC. 2006. Reduction in cryoprotectant concentrations on the vitrification of immature bovine oocytes, under a high cooling rate. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34: 309.
- Campos-Chillon LF, Walker DJ, de la Torre-Sanchez JF, Seidel GE. 2006. *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology*. 65: 1200-1214.
- Campos-Chillon LF, Suh TK, Barcelo-Fimbres M, Seidel GE, Carnevale EM. 2009. Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. *Theriogenology* 71: 349–354.
- Checura CM, Seidel GE. 2007. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. *Theriogenology*. 67: 919-930.

- Chen T, Fowler A, Toner M. 2000. Literature Review: Supplemented phase diagram of the trehalose–water binary mixture. *Cryobiology*. 40: 277-282.
- Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN and Yang YS. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reproduction*. 16: 2350-2356.
- Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chang LJ, Tsai YY, Yang YS. 2005. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Human Reproduction*. 20: 1975–1980.
- Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM, Tan SL. 2005. High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertility and Sterility* 84:36.
- Cho SK, Cjo SG, Bae IH, Park CS, Kong IK. 2002. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Animal Reproduction Science*. 73: 151-158.
- Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel OV, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ, Boland MP, Evans ACO, Lonergan P. 2006. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in *in vitro* compared with *in vivo* cultured bovine embryos. *Reproduction*. 131: 651–660.
- Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Barros A. 2004. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Human Reproduction*. 19: 300-305.

- Dattena M, Mara L, Bin AA, Cappai P. 2007. Lambing rate using vitrified blastocysts is improved by culture with BSA and hyaluronan. *Molecular reproduction and development* 74:42–47.
- Dinnyes A, Carolan C, Lonergan P, Solti L, Massip A, Mermillod P. 1995. *In vitro* survival of IVF bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology* 43: 197.
- Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 63:513-518.
- Dinnyes A, Nedambale TL. 2009. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. *Reprod Fertil and Development.* 21: 45–59.
- Dobrinsky JR. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology.* 45: 17-26.
- Dobrinsky JR. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology* 57:285-302.
- Dochi O, Imai K, Matoba S, Miyamura M, Hamano S, Koyama H. 2006. Essential methods of freezing embryos for application in animal reproduction management. *Journal of Reproduction and Development.* 52:65-70.
- Duby RT, Hill J L, O’Callaghan D, Overstrom EW, Boland M P. 1997. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts, *Theriogenology.* 47: 332.
- El-Gayar M, Gauly M, Holtz W. 2008. One-step dilution of open-pulled-straw (OPS)-vitrified mouse blastocysts in sucrose-free medium. *Cryobiology.* 57: 191-194

- Emiliani S, Bergh MVD, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. 2000. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Human Reproduction*. 15: 905-910
- Enright BP, Lonergan P, Dinnyes A, Fair T, Ward FA, Yang X, Boland MP. 2000. Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*. 54:659–673.
- Eroglu A, Lawitts JA, Toner M, Toth TL. 2003. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology*. 46(2): 121-134.
- Eroglu A, Elliott G, Wright DL, Toner M, Toth TL. 2005. Progressive elimination of microinjected trehalose during mouse embryonic development. *Reprod Biomed Online*. 10:503–510
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 21: 407-426.
- Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP. 2001. Ultrastructure of bovine blastocyst following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol Reprod Dev*. 58: 186-195.
- Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*. 78:203–16.
- Ferreira CR, Saraiva SA, Catharino RR, Garcia JS, Gozzo JC, Sanvido GB, Santos LF, Lo Turco EG, Pontes JHF, Basso AC, Bertoll RP, Sartori R, Guardieiro MM, Perecin F, Meirelles FV, Sangalli JR, Eberlin MN. 2010. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J Lipid Res*.51:1218-1227.

- Fuku E, Xia L, Downey BR. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*. 32: 139-56.
- Fuller B, Paynter S. 2004. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online*. 9: 680-691. 2004.
- George F, Daniaux C, Genicot G, Verhaeghe B, Lambert P, Donnay I. 2008. Set up of a serum-free culture system for bovine embryos: Embryo development and quality before and after transient transfer. *Theriogenology*. 69: 612-623.
- Ghanem N, Holker M, Rings F, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Torner H, Kanitz W, Schellander K & Tesfaye D. 2007. Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave. *BMC Developmental Biology*. 7: 1-19.
- Gomez E, Rodriguez A, Muñoz M, Caamaño JN, Hidalgo CO, Moran E, Facal N, Diez C. 2008. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* 69: 1013-1021.
- Goovaerts IGF, Leroy JLMR, Jorssen EPA, Bols PEJ. 2010. Noninvasive bovine oocyte quality assessment: possibilities of a single oocyte culture. *Theriogenology*. 74: 1509-1520.
- Gordon I. 2003. Recovering the bovine oocyte. In: *Laboratory production of cattle embryos*. 2nd ed. Cambridge, UK: CAB Cambridge University Press. 79–111.
- Guignot F, Bouttier A, Baril G, Salvetti P, Pignon P, Beckers JF, Touzé JL, Cognié J, Traldi AS, Cognié Y, Mermillod P. 2006. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos, *Theriogenology* 66: 1004–1011.

- Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. 2010. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and *in vitro* development of oocytes vitrified before or after *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*. 93: 2602-2607.
- Hadi H, Wahid H, Rosnina Y, Daliri M, Dashrizad M, Karamishabankareh H, Faizah A, Iswadi MI, Abas Mazni O. 2010. Selection of immature bovine oocytes using brilliant cresyl blue enhances nuclear maturity after vitrification. *J Anm Vet Adv*. 9:2710-2713.
- Hamawaki A, Kuwayama M, Hamano S. 1999. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology*. 51: 165.
- Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely, B, Shuey LS, Stokes JE, Trimmer SA. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 43:141-152.
- Hawk HW, Wall RJ. 1994. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*. 41:1585-94.
- He X, Park EYH, Fowler A, Yarmush ML, Toner M. 2008. Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: A study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology*. 56: 223-232.
- Heleil B, Fayed M. 2010. Developmental competence of buffalo oocytes from follicles of different diameters selected by BCB staining. *Global Veterinaria* 4: 176-184.
- Hochi S, Semple E, Leibo SP. 1996. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 46: 837-847.
- Hotamisligil S, Toner M, Powers RD. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biology of Reproduction*. 55: 161-168.

- Hredzak R, Ostró A, Zdilová V, Toporcerová S, Kacmárik J. 2005. Clinical experience with a modified method of human embryo vitrification. *Ceska Gynekol.* 70: 99-103.
- Hubalek Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 46: 205-229.
- Hyttel P, Vajta G, Callesen H. 2000. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: Ultrastructural consequences. *Molecular Reproduction and Development.* 56: 80-88.
- Inaba Y, Aikawa Y, Hirai T, Hashiyada Y, Yamanouchi T, Misumi K, Othake M, Somfai T, Kobayashi S, Saito N, Matoba S, Konishi K, Imai K. 2011. In-Straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using cryotop. *J Repr Dev* 57: 437-443.
- Isachenko V, Folch J, Isachenko E, Nawroth F, Krivokharchenko A, Vajta G, Dattena M, Alabart JL. 2003. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology.* 60: 445-452.
- Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka J, Miki Y, Seike N, Kainuma H. 1993. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology.* 40:427-33.
- Ishizaki C, Watanabe H, Bhuiyan MM, Fukui Y. 2009. Developmental competence of porcine oocytes selected by brilliant cresyl blue and matured individually in a chemically defined culture medium. *Theriogenology.* 72:72– 80.
- Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip P, Dessy F, Donnay I. 2001. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Biology of Reproduction.* 65: 1127–1134.

- Kasai M, Komi J1-I, 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.
- Kasai M, Nishimori M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biology of Reproduction.* 46: 1042-1046.
- Kasai M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science.* 42:67-75.
- Kasai M. 2002. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reprod Med Biol.* 1: 1-9.
- Kasai M; Mukaida T. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproductive Biomedicine online* 9: 164-170.
- Khurana NK, Niemman H. 2000. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. *Theriogenology.* 54: 313-326.
- Kong IK, Kong, Lee SI, Cho SG, Cho SK, Park CS. 2000. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology.* 53: 1817-1826.
- Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology.* 38: 119-130.
- Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology.* 43: 21-31.

- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive BioMedicine Online*. 11: 608-614.
- Kuwayama M. 2007. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*. 67: 73-80.
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol*. 17: 1234–1236.
- Lawson A, Ahmad H, Sambanis A. 2011. Cytotoxicity effects of cryoprotectants as single-component and cocktail vitrification solutions. *Cryobiology*. 62: 115-122.
- Leibo SP. 1980. Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. *J Membr Biol*. 53:179-88.
- Leroy JL, Van Hoeck MR, Clemente V, Rizos M, Gutierrez-Adan D, Van Soom A, Uytterhoeven A, Bols PEJ. 2010. The effect of nutritionally induced hyperlipidemia on *in vitro* embryo quality. *Hum. Reprod*. 25: 768–778.
- Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Levy MJ. 2002. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reproductive BioMedicine Online*. 4: 146-150.
- Liebermann J; Dietl J; Vanderzwalmen P; Tucker M. 2003. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now?. *Reproductive Biomedicine Online*. 7: 623-633.
- Liebermann J. 2012. Vitrification of Oocytes and Embryos. In: *Current frontiers on cryobiology*. In Tech. Published. Ed.1. 169-184
- Lindemans W, Sangalli L, Kick A, Earl CR, Fry RC. 2004. Vitrification of bovine embryos using the CLV method. *Reproduction, Fertility and Development* 16: 174.

- Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP. 2003. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*. 126:337-346.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans ACO. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*. 65:137-152.
- Madison V, Avery B, Greve T. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. *Anim Reprod Sci*. 27:1–11.
- Magnusson V, Feitosa WB, Goissis MD, Yamada C, Tavares LMT, Ortiz ME, Assumpcao DA, Visintin JA. 2008. Bovine oocyte vitrification: Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. *Anm Reprod Sci*. 106: 265–273.
- Manjunatha BM, Gupta PS, Devaraj M, Ravindra JP, Nandi S. 2007. Selection of developmentally competent buffalo oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM. *Theriogenology*. 68: 1299-304.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction*. 54: 1059–1069.
- Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. 1995. Morphology and biochemistry of *in-vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum Reprod*. 10: 3004-3011.
- Massip A. 2001. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. *Reprod Dom Anim*. 36: 49-55.
- Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*. 42: 139–144.

- 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, 9: 99-114.
- Mazur P, Pinn IL, Kleinhans FW. 2007. The temperature of intracellular ice formation in mouse oocytes vs. the unfrozen fraction at that temperature. *Cryobiology*. 54: 223-233.
- McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS and Speake BK. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 118:163-170.
- Men H, Monson RL, Rutledge JJ. 2002. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology*. 57: 1095-1103.
- Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59:651-74.
- Mezzalira A, Mezzalira JC, Moraes AN. 2004. Vitrification of bovine embryos: age of embryos and exposure time to cryoprotectant influences viability. *Arch of Vet Sci.* 9: 107- 111.
- Morató R, Izquierdo d, Paramio MT, Mogas T. 2008. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology*. 57: 137-141.
- Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 65: 1551-62.

- Muthukumar K, Mangalaraj AM, Kamath MS, George K 2008. Blastocyst cryopreservation: vitrification or slow freeze. *Fertility and Sterility*. 90: S426–S427.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman R, Grupen C, Seamark RF, Nottle MB. 1994. Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology*. 41:113-118.
- Nedambale TL, Dinnyes A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, Yang X. 2004. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 64:437-449.
- Nicacio AC, Simões R, de Paula-Lopes FF, de Barros FR, Peres MA, Assumpção ME, Visintin JA. 2011. Effects of different cryopreservation methods on post-thaw culture conditions of *in vitro* produced bovine embryos. *Zygote* 16: 1-6.
- Opiela J, Katska-Ksiazkiewics L, Lipinski D., Slomski R, Bzowska M, Rynska B. 2008. Interactions among activity of glucose- 6-phosphate dehydrogenase in immature oocytes, expression of apoptosis-related genes Bcl-2 and Bax, and developmental competence following IVP in cattle. *Theriogenology*. 69:546–55.
- Palasz AT, Mapletof RJ. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances*. 14: 127-149.
- Palasz AT, Thundathil J, Verrall RE, Mapletoft RJ. 2000. The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture. *Anim Reprod Sci*. 58: 229-40.
- Palasz AT, Rodriguez-Martinez H, Beltran-Brena P, Perez-Garnelo S, Martinez MF, Gutierrez-Adan A. 2006. Effects of hyaluronan, BSA, and serum on bovine embryo

- in vitro* development, ultrastructure, and gene expression patterns. *Mol Reprod Dev.* 73:1503–11.
- Palasz AT, Brena PB, Martinez MF, Perez-Garnelo SS, Ramirez MA, Gutierrez-Adan A. 2008. Development, molecular composition and freeze tolerance of bovine embryo cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. *Zygote.* 16:39–47.
- Palasz AT, Beltran Breña P, De la Fuente J, Gutierrez-Adan A. 2009. The effect of bovine embryo culture without proteins supplements until day 4 on transcription level of hyaluronan synthases, receptors and mtDNA content. *Zygote.* 18: 121–129.
- Papis K, Shimizu M, Izaike Y. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology.* 54: 651–658.
- Pawlak P, Pers-Kamczyc E, Renska N, Kubickova S, Lechniak D. 2011. Disturbances of nuclear maturation in BCB positive oocytes collected from peri-pubertal gilts. *Theriogenology.* 75: 832-40.
- Peachey B, Hartwich K, Cockrem K, Marsh A, Pugh A, VanWagtendonk J, Lindemans W. 2005. Assessment of viability of *in vitro* produced bovine embryos following vitrification by CVM or slow freezing with ethylene glycol and triple transfer. *Reprod Fert and Dev.* 17: 199.
- Pereira RM, Marques CC. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank.* 9:267-77.
- Pereira GR, Lorenzo PL, Carneiro GF, Bilodeau-Goeseels S, Kastelic JP, Esteller-Vico A, Linares Pereira IKM. 2010. Selection of developmental competence immature equine oocytes by Brilliant Cresyl Blue prior to maturation with equine growth hormone *in vitro*. *Animal Reproduction Science.* 121s. 248–S249.

- Pollard JW, Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*. 41:101–6.
- Pryor JH, Looney CR, Walker D, Seidel GE, Hasler JF, Kraemer DC and Romo S. 2007. Comparison between conventional direct transfer freezing and vitrification for the cryopreservation of *in vivo* embryos from brahman cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 19: 224 – 225.
- Pugh PA, Tervit HR, Niemann H. 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. *Anim Repr Sci*. 58: 9-22.
- Pujol M, López-Béjar M, Paramio MT. 2004. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology*. 61:735– 44.
- Rall WF, Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313: 573-575.
- Reinders JMC, Wurth YA, Kruip TAM. 1995. From embryo to a calf after embryo transfer, a comparison of *in vivo* and *in vitro* produced embryos. *Theriogenology*. 43: 306.
- Risco R, Elmoazzen H, Doughty M, He X, Toner M. 2007. Thermal performance of quartz capillaries for vitrification, *Cryobiology* 55: 222–229.
- Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P. 2002a. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Molecular reproduction and development*. 62:320–327.
- Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. 2002b. Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between

- Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. *Biology of Reproduction*. 66: 589-595.
- Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*. 68:236-243.
- Robertson I, Nelson RE. 2011. Certification and identification of the embryo. In: Strigfellow and Seidel SM (Eds). *Manual of International Emrbyo Transfer*. Illinois, USA; IETS. 103-117.
- Rodriguez P, Ongaratto FL, Silva DS, Rodrigues BA, Rodrigues JL. 2010. Survival of vitrified mouse blastocysts loaded into glass micro-capillaries. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 23:28-34.
- Rodriguez-González E, López-Béjar M, Velilla E, Paramio MT. 2002. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. *Theriogenology*. 57:1397– 409.
- Rodriguez-González E, López-Bejar M, Izquierdo D, Paramio MT. 2003. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reprod. Nutr. Dev*. 43: 179–187.
- Rodriguez Villamil P, Ongaratto FL, Silva DS, Rodrigues BA, Rodrigues JL. 2011. Survival rates of mouse blastocyst vitrified in dimethylformamide based solutions associated with ethylene glycol or 1-2 propanediol. *Ciencia Rural*. 41:1985-1990.
- Ruffing NA, Steponkus PL, Pitt RE, Parks JE. 1993. Osmometric behaviour, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology*. 30: 562-580.

- Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*. 33: 291–299.
- Sansinena M, Santos MV, Zaritzky N, Chirife J. 2011. Numerical simulation of cooling rates in vitrification systems used for oocyte cryopreservation. *Criobiology*. 63: 32-37.
- Saragusty J, Arav A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*. 141: 1-19.
- Saunders KM, Parks JE. 1999. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro* matured bovine oocytes. *Biol Reprod*. 61:178-187.
- Seidel GE Jr. 1986. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. En: *Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings*. Fort Collins: Colorado State University-Animal Reproduction Laboratory. 6-10.
- Seidel GE. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 65: 228 –35.
- Seki S, Mazur P. 2009. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology*. 59: 75–82.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. 2000. Fundamental cryobiology of mamalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*. 53: 59-72.
- Sheehan CB, Larman MG, Gardner DK. 2007. Bovine oocyte vitrification is improved by increased pyruvate concentration and the inclusion of hyaluronan in the vitrification medium. *Reproduction Fertility and Development*. 19: 183.

- Silva DS, Rodriguez P, Galuppo A, Arruda NS, Rodrigues JL. 2011. Selection of bovine oocytes by brilliant cresyl blue staining: effect on meiosis progression, organelle distribution and embryo development. *Zygote*. doi:10.1017/S0967199411000487.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 65: 126–36.
- Sommerfield V, Niemann H. 1999. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*. 38: 95-105.
- Sripunya N, Somfai T, Inaba Y, Nagai T, Imai K, Parnpai R. 2010. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of *in vitro* matured bovine oocytes. *J Reprod Dev*. 56(1):176-81.
- Stojkovic M, Kölle S, Peinl S, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Thompson JG, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Sinowatz F, Wolf E. 2002. Effects of high concentrations of hyaluronan in culture medium on development and survival rates of fresh and frozen–thawed bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction* 124: 141-153.
- Stroud B. 2010. The year 2009 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*. 28: 11-21.
- Tang M, Waring AJ, Hong M. 2007. Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion. *J Magn Reson*. 184: 222-7.
- Taniguchi M, Ikeda A, Arikawa E, Wongsrikeao, Agung B, Naoi H, Nagai T, Otoi T. 2007. Effect of cryoprotectant composition on *in vitro* viability of *in vitro* fertilized and cloned bovine embryos following vitrification in-straw dilution. *J Repr and Dev*. 53: 963-969.

- Thibier M. 2001. The animal embryo transfer industry in figures. Embryo Transfer Newsletter. 19:16-22.
- Thibier M. 2002. A contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry. Embryo transfer newsletter. 20:13-19.
- Thibier M. 2003. More than half a million bovine embryos transferred in 2002. Embryo Transfer Newsletter. 21:12-19.
- Thibier M. 2004. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. Embryo Transfer Newsletter . 22: 12-19.
- Thibier M. 2005. Significant increases in transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle and contrasted trends in other species in 2004. Embryo Transfer Newsletter. 23:17-22.
- Thibier M. 2006. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. Embryo Transfer Newsletter. 24:12-18.
- Thibier M. 2007. New records in the numbers of both *in vivo*-derived and *in vitro*-produced bovine embryos around the world in 2006. 25: 15-20.
- Thibier M. 2008. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. Embryo Transfer Newsletter. 26: 4-9.
- Thibier M. 2009. Data retrieval committee statistics of embryo transfer- year 2008. The worldwide statistics of embryo transfers in farm animals. Embryo Transfer Newsletter. 27: 13-19.
- Thompson JG. 2000. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos: a decade of achievement. Anim Reprod Sci. 60:263–75.

- Tian WN, Braunstien LD, Prang J, Stuhlmeir KM, Xiq C, Tian X, Statin RC. 1998. Importance of G6DPH activity for cell growth. *J. Biol. Chem.* 273: 10609-17.
- Tominaga K, Hamada Y. 2001. Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. *J Reprod Develop.* 47: 267-273.
- Toole BP. 2001. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 12:79-87.
- Torner H, Ghanem N, Ambros C, Hölker M, Tomek W, Phatsara C, Alm H, Sirard MA, Kanitz W, Schellander K, Tesfaye D. 2008. Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Reproduction.* 135:197–212.
- Urdaneta A, Jimenez-Macedo AR, Izquierdo N, Paramio MT. 2003. Supplementation with cysteamine during maturation and embryo culture on embryo development of prepuberal goat oocytes selected by brilliant cresyl blue test. *Zygote.* 11: 347-354.
- Vajta G. 1997. Vitrification of bovine oocytes and embryos. *Embryo Transfer Newsletter.* 15: 12-18.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development.* 51: 53–58.
- Vajta G, Murphy CN, Machaty Z, Prather RS, Greve T, Callesen H. 1999. In-straw dilution of bovine blastocyst after vitrification with the open pull straw method. *Veterinary Record* 144: 180-181.
- Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science.* 60: 357-364.
- Vajta G, Kuwayama M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* 65: 236-224.

- Vajta G, Nagy ZP. 2006. Are programable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*. 12: 779-796.
- Vajta G. 2010. Vitrification in ART – getting closer?. *Acta Scientiae veterinariae*. 38: 565-572.
- Vanderzwalde P, Bertin G, Debauche CH, Standaart V, Schoysman E. 2000. *In vitro* survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocyst after vitrification in an hemi-straw (HS) system. *Fertility and Sterility*. 74: 215-216.
- Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, Kruif A. 1992. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*. 38:905-919
- Van Wagendonk-de Leeuw AM, den Daas JHG, Rall WF. 1997. Field trial to compare pregnancy rates of bovine embryo cryopreservation methods: vitrification and one-step dilution versus slow freezing and three-step dilution. *Theriogenology*. 48: 1071-1084.
- Vieira AD, Mezzalana A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MIB, Vajta G, 2002. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*. 45: 91–94.
- Vieira AD, Forell F, Feltrin C, Rodrigues JL. 2007. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. *Anim Reprod Sci*. 99:377-83.
- Vieira AD, Forell F, Feltrin C, Rodrigues JL. 2008. Calves born after direct transfer of vitrified bovine *in vitro*-produced blastocysts derived from vitrified immature oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 43: 314-318.

- Visintin JA, Martins JFP, Bevilacqua EM, Mello MRB, Nicacio AC, Assumpcao MEOA. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different?. *Theriogenology* 57: 345-359.
- Voelkel SA, Hu YX. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*. 37:23–37.
- Wang X, Al Naib A, Sun DW, Lonergan P. 2010. Membrane permeability characteristics of bovine oocytes and development of a step-wise cryoprotectant adding and diluting protocol. *Cryobiology*. 61: 58-65.
- Whittingham DG, Leibo, SP, Mazur P. 1972. Survival of mouse embryo frozen to -196 and -296°C. *Science*. 178: 411-414.
- Wongsrikeao P, Otoi T, Yamasaki H, Agung B, Taniguchi M, Naoi H, Shimizu R, Nagai T. 2006. Effects of single and double exposure to brilliant cresyl blue on the selection of porcine oocytes for in vitro production of embryos. *Theriogenology*. 66: 366–372.
- Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 48: 146-156.
- Wowk B. 2000. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*. 40: 228-236.
- Wu YG, Liu Y, Zhou P, Lan GC, Han D, Miao DQ, Tan JH. 2007. Selection of oocytes for *in vitro* maturation by brilliant cresyl blue staining: a study using the mouse model. *Cell Research*. 17:722-731.
- Yang QE, Hou YP, Zhou GB, Yang ZQ, Zhu SE. 2007. Stepwise In-straw dilution and direct transfer using open pulled straw (OPS) in the mouse: A potential model for field manipulation of vitrified embryos. *J Repr Dev*. 53: 211-218.

- Yavin S, Arav A. 2007. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology* 67: 81-89.
- Yavin S, Arroyo A, Roth Z, Arav A. 2009. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Human Reproduction*. 24: 797–804.
- Yu XL, Deng W, Liu FJ, Li YH, Li XX, Zhang YL, Zan LS. 2010. Closed pulled straw vitrification of *in vitro*-produced and *in vivo*-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 73: 474-479.
- Zhou XL, Naib A, Sun DW, Lonergan P. 2010. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. *Cryobiology*. 61: 66-72.