

**Universidad Católica de Temuco
Facultad de Recursos Naturales
Escuela de Medicina Veterinaria**



Evaluación de la tasa de maduración *in vitro* de ovocitos bovinos congelados por el método Open Pulled Straw

Alumna: Nelda Viviana Calderón Riquelme

Profesor Guía: Mauricio Silva Jiménez M.V., Mg. Cs.

Informante Interno: Marco Berland Olea M., Mg. Cs.

Informante Externo: Santiago Peredo Faure

TEMUCO 2005.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	3
Summary	4
Introducción	5
Antecedentes Bibliográficos	7
Hipótesis y Objetivos	15
Material y Método	16
Resultados	21
Discusión	25
Conclusiones	30
Bibliografía	31

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue vitrificar ovocitos bovinos madurados *in vitro* por el método Open Pulled Straw (OPS) y evaluar las características nucleares post descongelación.

Ovocitos fueron recuperados de ovarios de hembras bovinas provenientes del frigorífico local. Los complejos cúmulus-ovocitos (CCO) fueron aspirados de folículos de 2-8 mm. de diámetro. Luego de una selección fueron repartidos aleatoriamente en dos grupos. El grupo control se maduró por 24 h, mientras que los ovocitos del grupo tratamiento fueron desnudados a las 6 h de iniciado la maduración *in vitro* y vitrificados a las 22 h de la maduración por el método OPS. El medio de maduración utilizado fue TCM-199 + 10% suero de ternero (ST), gentamicina (50mg/ml), piruvato de sodio (0.2mM), FSH (0.08ug/ml), LH 1(ug/ml) y estradiol (1ug/ml).

Previo a la vitrificación, los ovocitos fueron expuestos a la solución de equilibrio (PBS + suero fetal bovino (SFB) al 5 %) a una temperatura de 41° C. Luego los ovocitos fueron trasladados a la solución de vitrificación uno (VS1) (800µl de PBS + 100µl de EG + 100 µl de DMSO) por un periodo de 30 seg., posteriormente fueron traspasados a la VS2 (600 µl de SM + 200 µl de EG + 200 µl de DMSO) por 25 seg. Los ovocitos fueron cargados dentro de pajuelas francesas estiradas con 3 µl de VS2 y sumergidas directamente en nitrógeno líquido siendo almacenadas al menos por 5 días.

Las pajuelas fueron descongeladas introduciéndolas en la solución de descongelación 1 (800 µl de PBS + SF 5%+ 0.3 M de medio sucrosa (MS) donde se localizaron los ovocitos. Luego se traspasaron a la segunda solución de descongelación (800 µl de PBS + SF 5%+ 0.3 M MS) por 1 min. Posteriormente se traspasaron a la tercera solución de descongelación (800 µl de PBS + SFB 5%+ 0.15 M MS) por 5 min. Por último se traspasaron a la cuarta solución de descongelación (800 µl de PBS + SFB 5%). Los ovocitos finalmente se lavaron en medio de maduración a 39° C para posteriormente ser depositados en grupos de a 10-12 en gotas de maduración de 50µl por 2 h adicionales.

Posterior al periodo de maduración, los ovocitos de ambos grupos fueron teñidos con orceína acética al 1% para luego evaluar la morfología nuclear, mediante microscopio de contraste de fase. Las proporciones de ovocitos en M I, M II y degenerados obtenidos de cada grupo fueron analizados por el test de chi cuadrado, con un nivel de significancia del 5%

El porcentaje de pérdida durante el proceso de maduración fue de 4% para el grupo control y un 19% para el grupo tratamiento debido al procedimiento de vitrificación. Se observó un aumento significativo de ovocitos en estado de M I en el grupo tratamiento respecto al grupo control (39.7 v/s 12.1 %). El porcentaje de ovocitos degenerados fue de 23 y 13.6% para los grupos tratamiento y control respectivamente, observándose diferencias significativas entre ambos grupos. El porcentaje de ovocitos recuperados post descongelación en estado de M II fue significativamente menor en el grupo tratamiento (37.3 v/s 74.2 %).

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que la vitrificación por el método Open Pulled Straw de ovocitos bovinos madurados *in vitro* disminuye significativamente la tasa de M II obtenida post descongelación en comparación con ovocitos no criopreservados.

Palabras claves: bovinos, ovocitos, maduración, vitrificación OPS

SUMMARY

The aim of this study was to vitrify *in vitro* matured bovine oocytes by the Open Pulled Straw method (OPS) and to evaluate their nuclear characteristics post thawing.

Oocytes were recovered from ovaries obtained at the local slaughterhouse. Cumulus-oocytes complexes (COC) were aspirated from follicles in 2-8 mm in diameter. Selected oocytes were randomly distributed into two groups. Oocytes from control group were matured for 24 h, while the oocytes from treatment group, were partially denuded at 6 h after the start of *in vitro* maturation and vitrified after 22 h of the maturation by the OPS method. The maturation medium was TCM-199 + 10% calf serum (CS), gentamicin (50mg/ml), sodium pyruvate (0.2mM), FSH (0.08ug/ml), LH 1 (ug/ml) and oestradiol (1ug/ml).

Oocytes were exposed to the equilibration solution (PBS + 5 %bovine fetal serum (BFS)) at 41° C. The oocytes were then placed in the vitrification solution one (VS1) (800 µl PBS+ 100 µl EG + 100 µl DMSO) for 30 seg. Then transferred to VS2 (600 µl SM + 200 µl EG + 200 µl DMSO) for 20-25 seg. Oocytes were loaded into open pulled straws in 3 µl of VS2 and plunged directly into liquid nitrogen where were stored at least for 5 days.

Straws were thawed introducing them in the thawing solution 1 (800 µl PBS + BFS 5%+ 0.3 M sucrosa medium (SM) on which oocytes were located. Afterwards oocytes were transferred to the second thawing solution (800 µl PBS + BFS 5%+ 0.3 M SM) for 1 min. Then they were transferred to a third solution (800 µl PBS+ BFS 5%+ 0.15 M SM) for 5 min. Afterwards they were transferred to solution 4 (800µl PBS + BFS 5%). The oocytes finally were washed in the maturation medium (TCM-199 + 10% calf serum, gentamicina (50mg/ml), sodium pyruvate (0.2mM), FSH (0.08ug/ml), and oestradiol (1ug/ml)) at 39° C to be deposited later in drops of maturation of 50µl in groups of 10- 12 oocytes for additional 2- 3 h.

Subsequent to the maturation period, oocytes from both groups were stained with 1% orcein acetic to evaluate their nuclear status by phase contrast microscope. The proportions of M I oocytes, M II and degenerated oocytes were analyzed by chi square test with a level of significance at 5%.

The oocyte loss rate during the maturation process was 4% for the control group and 19% for the treatment group due to vitrification procedure. It was observed an significant increase of oocytes in state of M I in the treatment group respect to control group (39,7 v/s 12,1 %). The percentage of degenerated oocytes was 23 and 13.6 % for the treatment and control groups being this difference statistically significant. The percentage of M II oocytes recovered post-thawing was significantly lower in the treatment group (37,3 v/s 74,2 %).

According to these results it is possible to conclude that vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes by Open Pulled Straw method decrease the percentage of M II oocytes obtained after thawing.

Key words: bovine, oocytes, maturation, OPS vitrification.

INTRODUCCION

Desde el primer resultado exitoso en la criopreservación de embriones mamíferos entregado por Whittingham (1972), han habido diversos reportes en la criopreservación de ovocitos y embriones. En el bovino, las técnicas de criopreservación se han enfocado principalmente en el estado embrionario de mórula o blastocisto (Moore y col., 1977; Massip y col.,1987) y en contraste con los estudios más avanzados con embriones bovinos, la información de criopreservación de ovocitos bovinos no fecundados es escasa y las tasas de desarrollo de ovocitos congelados y descongelados son bajas aún (Otoi y col.,1997).

En general, ovocitos bovinos congelados-descongelados poseen menor potencial de desarrollo en comparación con embriones en estado de preimplantación tardía. Esto ocurre debido a que los cromosomas se activan durante la maduración y el proceso de congelación tiene diversos efectos tóxicos en cromosomas activados (Sathananthan y col.,1987). Además la permeabilidad de membrana de los ovocitos a los crioprotectores, especialmente al glicerol, se relaciona con su capacidad de desarrollo post descongelación, y ovocitos no fecundados tiene una permeabilidad de membrana más baja que embriones y ovocitos fecundados (Mazur, 1977; Jackowsky y col., 1980).

Con las modificaciones del método de congelación tradicional la Vitricación se considera como una alternativa prometedora ya que disminuye los riesgos de la criopreservación. La vitricación requiere altas concentraciones de crioprotectores y altas tasas de congelamiento para alcanzar la solidificación de la solución sin la formación de cristales de hielo. Avances en criopreservación de ovocitos y embriones se han logrado utilizando nuevas tecnologías con tasas de congelamiento y descongelamiento extremadamente altas (sobre 20.000 a 25.000°C/min) (Arav y Zeron, 1997). Una de estas

tecnologías de vitrificación con la técnica Open Pulled Straw, es una buena posibilidad práctica, de amplia aplicación (Vajta y col,1999).

La criopreservación de ovocitos puede ser utilizada en combinación con otras tecnologías reproductivas para manejar la crianza del ganado y la conservación de material genético en extinción (establecimiento de bancos) (Otoi y col., 1996); podría ser también muy útil para la producción de animales transgénicos, o la producción *in vitro* para programas de crianza (Arav y col., 1996). Permitiría también facilitar la planificación en la producción *in vitro* de embriones utilizando ovocitos de vacas sacrificadas para propósitos experimentales y el uso de estos ovocitos desde la misma donante para testear el semen de distintos toros al mismo tiempo (Le Gal y Massip,1999).

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

Criopreservación de ovocitos

El ovocito es una célula única y grande rodeada por la zona pelúcida (ZP) y por distintas capas de células de la granulosa formando el complejo cumulus ovocito (CCO). Las células de la granulosa inmediatamente adyacentes al ovocito, la corona radiata, tienen largas extensiones citoplasmáticas las que penetran la ZP y terminan en dilataciones bulbosas estrechamente asociadas con la membrana del ovocito (Massip, 2003). La presencia de estos procesos y de las uniones gap juegan un rol importante en la cooperación metabólica entre el ovocito y las células del cúmulo durante la fase de crecimiento del mismo (Van Soom y *col.*,2002).

El ovocito detenido en metafase II (M II) contiene un aparato del huso periférico con los microtúbulos extendiéndose desde cada polo a los cinetocoros de los cromosomas bivalentes (Parks y Ruffing, 1992). Cromosomas en el ordenamiento de metafase y el material pericentriolar asociado con cada polo actúan como centro organizador de microtúbulos para la polimerización de tubulinas durante la formación del huso (Sathananthan y *col.*,1986; Wasserman, 1988). Durante la M II, los gránulos corticales (GC) derivados del aparato de Golgi, se posicionan inmediatamente subyacente al oolema donde son gatillados para experimentar la exocitosis en la fecundación (Parks y Ruffing,1992).

Las claves al criopreservar ovocitos son las características estructurales y moleculares del citoesqueleto, el huso mitótico, el oolema y la ZP, y la distribución de los GC en el ooplasma (Parks y Ruffing, 1992). La disposición de los microfilamentos contenedores de actina se encuentran en la zona perinuclear y cortical del ooplasma. Estos microfilamentos están implicados en la distribución de las organelas durante la maduración del ovocito, deformaciones superficiales asociadas con extrusión de cuerpos

polares, motilidad y en la entrada del espermatozoide (Sathananthan y *col.*,1986; Wasserman, 1988).

Se ha obtenido descendencia después de la transferencia de embriones congelados y descongelados provenientes de ovocitos de coneja, vaca y mujer (Chen,1986, Van Uem y *col.*,1987; Al Hasni y *col.*,1989; Vicent y *col.*,1989; Fuku y *col.*,1992). En general la tasa de éxito es baja, principalmente por la reducida tasa de fecundación después de la congelación y de la descongelación. En ratona, el 50% de los ovocitos no son fecundados después de la descongelación porque los cambios en la ZP impiden la penetración de los espermatozoides. Sin embargo, rompiendo o retirando la ZP, la tasa de fecundación alcanza niveles normales. Esto sugiere que las alteraciones de la ZP ocurren durante el proceso de congelación y descongelación (Plasz y del Campo,1995).

Los agentes crioprotectores (ACP) son necesarios para el congelamiento de células y tejidos, pero también pueden causar daño celular debido al efecto osmótico o por toxicidad química (Parks y Ruffing,1992). Algunos crioprotectores como glicerol (G), dimetilsulfoxido (DMSO), etilenglicol (EG), polivinil pirrolidona (PVP) y sucrosa son utilizados como sustancias protectoras contra el congelamiento. Los crioprotectores permeables de bajo peso molecular como el Glicerol, reemplazan osmóticamente el agua intracelular en los embriones antes y durante la congelación y en combinación con tasas de congelación lentas y controladas minimizan la formación de cristales de hielo dentro de los embriones. La acción crioprotectora de sustancias no permeables de bajo peso molecular como la Sucrosa está basada en la inducción de la deshidratación de las células antes del proceso de congelación, lo cual también previene la formación de cristales de hielo durante la congelación. Los crioprotectores de alto peso molecular (PVP, almidón hidroxietil, hialuronato de sodio) protegen los embriones durante la congelación y

la descongelación, mediante la alteración de cristales de hielo a un tamaño y forma inocua (Plasz y Del Campo,1995).

En diversos estudios se ha demostrado que los ACP tienen efectos en elementos del citoesqueleto de ovocitos mamíferos (Parks y Ruffing.,1992). Johnson y Pickering (1987) demostraron que una breve exposición de ovocitos de ratona a 1.5 M de DMSO promueve la polimerización de tubulina, causando formación de un aster anormal en el polo del huso y en el citoplasma. Además la adición de crioprotectores conduce a la liberación de los GC con el subsiguiente endurecimiento de la ZP y la reducción de las tasas de fecundación en ratona. (Vicent y *col.*, 1990). Los alcoholes y los agentes que tienen un grupo –OH son potentes activadores partenogénéticos de ovocitos mamíferos. En 1989 Shaw y Trounson demostraron que el propilenglicol (PROH) puede ser un potente activador partenogénético de ovocitos de ratona.

Además del congelamiento los procesos de descongelamiento y recalentamiento posterior a la criopreservación, tienen un importante rol para la sobrevivencia de los CCO, puesto que el ovocito tiene que ser rehidratado y el crioprotector removido. Un ejemplo de crioprotector utilizado en estos procedimientos es la sucrosa, la cual ha demostrado tener una influencia benéfica durante la remoción de crioprotectores como el DMSO y el EG (Nieman y *col.*, 1982)

Existen numerosos estudios que determinan la habilidad de ovocitos bovinos en distintos estados de maduración para sobrevivir al congelamiento y descongelamiento. Im y *col.* (1997); Hochi y *col.* (1998) y Luna y *col.* (2001) demostraron que el estado de maduración tiene una influencia significativa en la competencia en el desarrollo de ovocitos después de la criopreservación, cuando se criopreservan ovocitos en distintos tiempos del proceso de maduración y en distintos estados meióticos, demostrando distintas sensibilidades al enfriamiento. Lim y *col.* (1992); concluyeron que la

congelabilidad de ovocitos inmaduros fue inferior de aquellos ovocitos madurando o madurados incluso, algunos de esos ovocitos congelados y descongelados se desarrollaron hasta estado de blastocisto luego de la inseminación. Por otro lado Luna y *col.* (2001) y Men y *col.* (2002) demuestran que los protocolos de maduración también afectan la habilidad del ovocito para tolerar la criopreservación.

La exposición de los ovocitos maduros a los crioprotectores y/o enfriamiento desde 37° C a 20° C o menos causa variadas alteraciones en el citoesqueleto y en los cromosomas como dispersión de cromosomas y despolimerización de microtúbulos (Aman y Parks, 1994; Saunders y Parks, 1999). También hay cambios en la composición y permeabilidad en la membrana plasmática durante la maduración (Agca y *col.*, 1998). Sin embargo, se han obtenido terneros desde ovocitos maduros que han sido congelados lentamente (Fuku y *col.*, 1992; Otoi y *col.*, 1993, Otoi y *col.*, 1995; Kubota y *col.*, 1998) como también de aquellos vitrificados (Hamano y *col.*, 1992, Le Gal y *col.*, 2000).

Vitrificación

En 1985, Rall y Fahy introdujeron la vitrificación como método de criopreservar embriones mamíferos en ausencia de hielo. Después de esta primera aplicación exitosa se supuso una rápida aplicación de este método en la embriología de animales domésticos; sin embargo, a pesar de las ventajas de la vitrificación (simplicidad, eficiente en costos, velocidad del procedimiento) ampliamente conocidas (Gordon, 1994) sólo se ha restringido principalmente a estudios experimentales (Vajta, 2000). La definición física de vitrificación es la solidificación de una solución (formación de vidrio) a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo. El fenómeno puede ser observado como un incremento en la viscosidad y requiere de rápidas tasas de congelamiento o el uso de soluciones crioprotectoras, que deprimen la formación de cristales de hielo e incrementan la viscosidad a bajas temperaturas (Vajta, 2000).

La estrategia de la vitrificación es básicamente diferente a los métodos de congelación lentos. Una tasa lenta de enfriamiento intenta mantener el delicado balance entre varios factores, los cuales pueden resultar en daño, como formación de cristales de hielo, injuria osmótica, efectos tóxicos de crioprotectores, concentración de electrolitos intracelulares, daño por enfriamiento, fractura de zona pelúcida y embrión, y alteraciones de organelas intracelulares, citoesqueleto y contacto entre células (Dobrinisky,1996; Saha y col.,1996).

Una consecuencia negativa de esta estrategia es el aumento en la probabilidad de las distintas formas de injuria excepto aquellas causadas por la formación de cristales de hielo (Vajta,2000). Diferentes aproximaciones son utilizadas para minimizar la toxicidad e injurias osmóticas como por ejemplo aplicación de químicos menos tóxicos, combinación de dos o tres crioprotectores (incluyendo al menos uno permeable), adición graduada y/o exposición de células a soluciones pre-enfriadas (Massip y col, 1987; Vajta,2000).

Por otro lado, la estrategia radical de la vitrificación ha resultado en una consecuencia positiva aparte de la total eliminación en la formación de hielo. El incremento en las tasas de enfriamiento disminuyen el daño por enfriamiento, por ejemplo daño por gotas lipídicas intracelulares, citoesqueleto y membranas de fosfolípido, pasando rápidamente a través de la zona peligrosa entre +15° a -5° C (Dobrinisky, 1996). Además, la vitrificación no requiere de equipamientos costosos o técnicas especiales y puede ser ejecutada muy rápidamente (Vajta, 2000).

Palasz y Mapletoft (1996), señalan que los métodos de vitrificación de embriones que emplean pajuelas de inseminación (0.25 ml) selladas e introducidas directamente al nitrógeno líquido, presentan una tasa de congelación aproximada de 2.500°C/min. Por otra parte, Vajta y col. (1999) señalan que muchos métodos de vitrificación utilizan pajuelas francesas estándar para mantener al embrión durante la congelación, almacenamiento y descongelación, donde experimentan una tasa de congelación y

descongelación menor a los 2.000°C/min. La mayoría de los métodos tradicionales de vitrificación utilizan la pajuela plástica francesa (french mini straw) para la congelación, almacenamiento y descongelación de los embriones (Vajta y col., 1999).

La vitrificación ha sido exitosa en otras especies domésticas como ovinos (Martínez y Matkovic 1998), equinos, porcinos (Dobrinsky, 2002) y caprinos (Gordon, 1994).

Open Pulled Straw

La modificación de la vitrificación ha resultado en la técnica de pajuela abierta (Open Pulled Straw, OPS), la cual permite una tasa de sobrevivencia satisfactoria de todos los estados de desarrollo de los embriones (Lazar y col., 2000). Esta técnica se basa en la disminución del diámetro de la pajuela que por consiguiente aumenta la relación área-superficie, aumentando las tasas de enfriamiento de las soluciones durante la vitrificación (Dobrinsky, 2002). Con el método OPS la tasa de enfriamiento es de aproximadamente 20.000° C/min. Como este método es relativamente simple y puede usar las herramientas tradicionales de criopreservación de semen y embriones, se aplicó rápidamente para diversos propósitos. Además, en el método de dilución directa en la pajuela es posible lograr una alta sobrevivencia, tasas de preñez y nacimiento con embriones producidos in vitro (Lewis, 1999; Vajta, 2000).

Este nuevo método de vitrificación de alta velocidad disminuye dramáticamente el daño por injuria, permitiendo el uso de soluciones menos concentradas y por lo tanto menos tóxicas, y un corto tiempo de exposición con el crioprotector final, tanto antes del enfriamiento como al calentamiento (Vajta, 2000).

La vitrificación por el método OPS ha sido utilizada exitosamente para criopreservar embriones porcinos como también embriones y ovocitos bovinos (Vajta y col., 1999). Las ventajas de este método son 1) La disminución del grosor de la pared de la pajuela, lo cual disminuye el efecto de termo-aislamiento; 2) la disminución del diámetro

interno de la pajuela lo cual reduce el volumen de la columna de líquido; 3) el contacto directo entre el nitrógeno líquido y el embrión, lo cual aumenta la velocidad de enfriamiento; 4) el descongelamiento se puede realizar con contacto directo entre el crioprotector y la solución diluyente (Lazar y col., 2000); 5) la disminución de las concentraciones de los crioprotectores utilizados, con los consecuentes menores efectos osmóticos y tóxicos, y 6) el paso más rápido por la zona de temperatura peligrosa lo que produce menos daños por enfriamiento (chilling injure) (Vajta y col., 1999).

Vajta y col. (1998) reportaron que con OPS la tasa de congelamiento es de siete a diez veces más rápida que con las pajuelas convencionales. Esto se ve corroborado en el trabajo de Le Gal y Massip (1999), donde logró disminuir el tiempo de exposición desde la exposición al crioprotector a la inmersión de las pajuelas al nitrógeno líquido de 75 a 90 segundos a solo 45 – 60 segundos con el método OPS.

Planteamiento del Problema.

Los antecedentes de la literatura revisada muestran que se han utilizado diferentes técnicas y metodologías para la congelación de ovocitos bovinos y para la evaluación del procedimiento. En general los resultados de los estudios en esta área son escasos y de poco éxito debido a las bajas tasas de sobrevivencia de los ovocitos y el bajo desarrollo de estos para llegar a formar blastocistos.

El congelamiento de ovocitos induce anormalidades cromosómicas como placas de metafase desorganizadas y husos multipolares. La criopreservación produce daño directo por enfriamiento en el segundo huso mitótico (M II), se interrumpen los microtúbulos (despolimerización de tubulina). También se afecta la zona pelúcida, disminuyendo las tasas de fertilidad por la exocitosis de gránulos corticales llevando a una prematura reacción cortical.

El método OPS ofrece una alternativa más viable para la sobrevivencia de ovocitos bovinos producidos *in vitro* debido a que las tasas de congelación aproximadamente alcanzan los 20.000 °C/min, lo que disminuye dramáticamente el daño por enfriamiento, permitiendo el uso de soluciones menos concentradas por tanto menos tóxicas, y acortar el tiempo de exposición con la solución crioprotectora final antes del enfriamiento y calentamiento.

Presentados estos antecedentes podemos pensar que el método OPS da una garantía de mejorar las tasas de sobrevivencia de ovocitos bovinos, facilitando el almacenamiento de plasma germinal femenino.

HIPOTESIS

Ovocitos bovinos madurados *in vitro*, vitrificados a través del método de pajuela abierta (Open Pulled Straw), presentan tasas de metafase II post descongelación iguales a las de ovocitos madurados *in vitro* que no fueron vitrificados.

OBJETIVOS

Objetivo General

- ✓ Evaluar las características morfológicas y de estado nuclear (maduración nuclear) post-descongelación en ovocitos bovinos madurados *in vitro* vitrificados por el método Open Pulled Straw.

Objetivos Específicos

- ✓ Criopreservar ovocitos bovinos sometidos a maduración *in vitro* mediante vitrificación por el método del Open Pulled Straw (OPS).
- ✓ Determinar la tasa de maduración *in vitro* post descongelación de los ovocitos vitrificados.
- ✓ Determinar las características post-descongelación de ovocitos sometidos a un proceso de maduración *in vitro* y vitrificación por el método OPS

MATERIALES Y METODOS

1.- Obtención de ovocitos:

Se obtuvieron ovarios de hembras faenadas del Frigorífico Temuco. Estos fueron colectados inmediatamente después del eviscerado de las hembras y depositados en termos con solución fisiológica, adicionada con 100 mg de Estreptomicina y 80 mg de Penicilina G Sódica a una temperatura de 38° C aproximadamente. Luego de obtener los ovarios, estos fueron transportados al laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Católica de Temuco, en un tiempo no superior a las 3 horas post faenamiento.

Recuperación de ovocitos

Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron lavados en solución fisiológica temperada a 38° C aproximadamente. Posteriormente los ovarios fueron mantenidos en Baño María a 37° C en esta misma solución en un vaso precipitado de 1000 ml.

Para la recuperación de los ovocitos, fueron aspirados todos aquellos folículos entre 2-8 mm de diámetro. La aspiración se realizó en forma manual utilizando una aguja de 18 G y jeringa de 10 ml la cual contiene solución buffer fosfato salino (PBS), adicionada con 0,3% de albúmina sérica bovina, 100 mg/litro de estreptomicina y 80 mg/litro de penicilina G sódica, a 37° C.

El contenido de la jeringa fue vertido en tubos cónicos graduados de vidrio de 15 ml, mantenidos en Baño María a 37°C. Una vez finalizado el proceso de aspiración los tubos fueron transportados a una platina temperada para vaciar su contenido (sedimento) a placas Petri cuya superficie inferior fue previamente cuadrículada para facilitar la búsqueda de los ovocitos. Estas placas fueron mantenidas sobre una platina temperada a 37° C.

Los ovocitos fueron buscados bajo lupa estereoscópica a un aumento de 20x, una vez identificados fueron depositados en una placa Petri la cual contenía PBS mantenida sobre la platina temperada a 37° C.

Los ovocitos seleccionados para la maduración *in vitro* fueron lavados dos veces en el medio de maduración para posteriormente ser depositadas en las gotas del medio de maduración.

Maduración de ovocitos

Los ovocitos seleccionados fueron transportados a las gotas de maduración de 50ul, en grupos de 10 a 12 ovocitos por gota. El medio de maduración utilizado corresponde a TCM-199 adicionado con 10% Suero de ternero, gentamicina (50ug/ml), piruvato de sodio (0.2mM), FSH (0.08ug/ml), LH (1ug/ml), y estradiol (1ug/ml). Las gotas fueron recubiertas por aceite mineral.

Previo a transportar los ovocitos a las gotas de maduración, éstos fueron seleccionados aleatoriamente en dos grupos. El grupo Control, siguió el procedimiento normal de maduración por 24 h a 38.5° C con una atmósfera de 5% de CO₂ y humedad saturada. Los ovocitos del grupo Tratamiento, se incubaron por 6 h, tras lo cual se desnudaron parcialmente con un pipeteo suave de las células del cumulus en medio PBS con suero fetal bovino (SFB) al 5 % para quedar aproximadamente con dos a tres capas de células. Posteriormente fueron lavados en medio de maduración a 38.5° C para ser devueltos a sus respectivas gotas de maduración hasta completar las 22 h de cultivo. Las condiciones del cultivo son iguales a las ya mencionadas para el grupo control.

2.- Congelación de ovocitos con el método Open Pulled Straw.

Se utilizó el protocolo descrito por Vajta y col. (1997). Las pajuelas francesas de 0,25 ml fueron calentadas en su tercio medio sobre una platina temperada, para posteriormente realizar una tracción manual hasta lograr la reducción en un 50% del diámetro de la misma. Posteriormente se cortaron en la porción más delgada obteniendo dos pajuelas aptas para el proceso.

Los ovocitos fueron lavados en grupos de 4 a 5 en PBS adicionado con SFB al 5%. Luego fueron depositados en el mismo medio hasta comenzar con el proceso de equilibrio en las soluciones crioprotectoras

Posteriormente fueron depositados en la primera solución de vitrificación consistente en 800µl de PBS (5% SFB) + 100µl de etilenglicol (EG) + 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a una temperatura de 41° C por 30 segundos. Luego fueron trasladados a la segunda solución de vitrificación consistente en 600 µl de medio sucrosa (MS) + 200 µl EG + 200 µl DMSO por 25 segundos, periodo durante el cual se formó una pequeña gota de 3µl con una micro pipeta, conteniendo los ovocitos y desde la cual fue tomado por capilaridad con la pajuela plástica previamente estirada manualmente con la aplicación de calor. Inmediatamente posterior a este procedimiento la pajuela fue sumergida en nitrógeno líquido, medio en el cual los ovocitos fueron mantenidos hasta su descongelación y posterior evaluación.

El grupo tratamiento se mantuvo bajo congelación a -196° C en nitrógeno líquido por un tiempo mínimo de 5 días.

Para la descongelación las pajuelas fueron retiradas individualmente desde el nitrógeno líquido y el extremo más delgado, que contiene la columna de medio congelado, fue rápidamente depositado en una solución de 800 µl PBS (SFB 5 %) y 400 µl de medio MS,

donde los ovocitos fueron localizados. Luego se trasladaron a la segunda solución de descongelación consistente en 800 μ l PBS (SFB 5 %) y 400 μ l SM por 1 minuto.

Posteriormente se traspasaron a la tercera solución de descongelación, 800 μ l PBS (SFB 5 %) y 200 μ l MS, por 5 min. Finalmente fueron traspasados a la cuarta solución de descongelación, 800 μ l PBS (SFB 5 %). Todas las soluciones de descongelación estuvieron sobre una platina temperada a 41° C. Los ovocitos fueron lavados en el medio de maduración a 39° C para posteriormente ser depositados en grupos de a 10-12 en gotas de maduración por un periodo de 2 a 3 h.

4.- Fijación y Tinción de ovocitos.

En ambos grupos Control y Tratamiento, una vez completado el periodo de 24 h de maduración, los ovocitos fueron traspasados a un tubo Eppendorf con el mínimo de PBS para extraer mecánicamente las células del cumulus, por 3 minutos. Posteriormente se depositaron los ovocitos con la cantidad mínima de medio en un porta objeto (no más de 20 por porta objeto) para ser cubiertos con un cubre objeto con parafina sólida en los 4 extremos.

Una vez montados los ovocitos en el porta objeto se fijaron en alcohol-acético por 12 h. Al transcurrir las 12 h se sacó el porta objeto del fijador, secando la superficie interna para cubrir los ovocitos con orceína acética al 1 % por 15 minutos. Finalmente se dejó escurrir la solución decolorante (ácido acético glacial, glicerol, agua destilada) hasta alcanzar transparencia y se sellaron los cubre objetos al porta objeto con cutex.

Análisis estadístico.

Las características nucleares de los ovocitos analizados fueron divididas en tres clases: Estado de Avance o Metafase I, Metafase II y Degenerados. En los primeros se incluyeron aquellos en que no hay rastro de membrana nuclear, los cromosomas se forman y arreglan en una secuencia ordenada, placa metafásica, en el plano ecuatorial del huso meiótico (metafase I) y aquellos que reasumieron la meiosis pero que no alcanzaron la fase de M II. En los ovocitos en M II el cuerpo polar ha sido extruído del ovocito (primer cuerpo polar), y los cromosomas una vez más se ordenan en el plano ecuatorial del huso meiótico. En los ovocitos considerados como Degenerados se incluyeron: alteraciones en el citoplasma (vacuolas), dañados durante los procedimientos del experimento y aquellos en que no es posible identificar estructuras intracelulares (Indeterminados)

Se evaluó el porcentaje de pérdida, referido al número de ovocitos perdidos durante el proceso. Las proporciones de ovocitos en MI, MII y degenerados en los grupos control y tratamiento fueron analizadas bajo el método de distribución de Chi-cuadrado. El nivel de significancia a considerar fue del 5%.

RESULTADOS

Tasa de Pérdida

Se maduró un total de 293 ovocitos (7 ensayos), de los cuales 156 correspondieron al grupo tratamiento y 137 al grupo control. Del grupo tratamiento se recuperó un total de 126 ovocitos post descongelación y en grupo control se evaluaron posteriormente a la tinción 132 ovocitos.

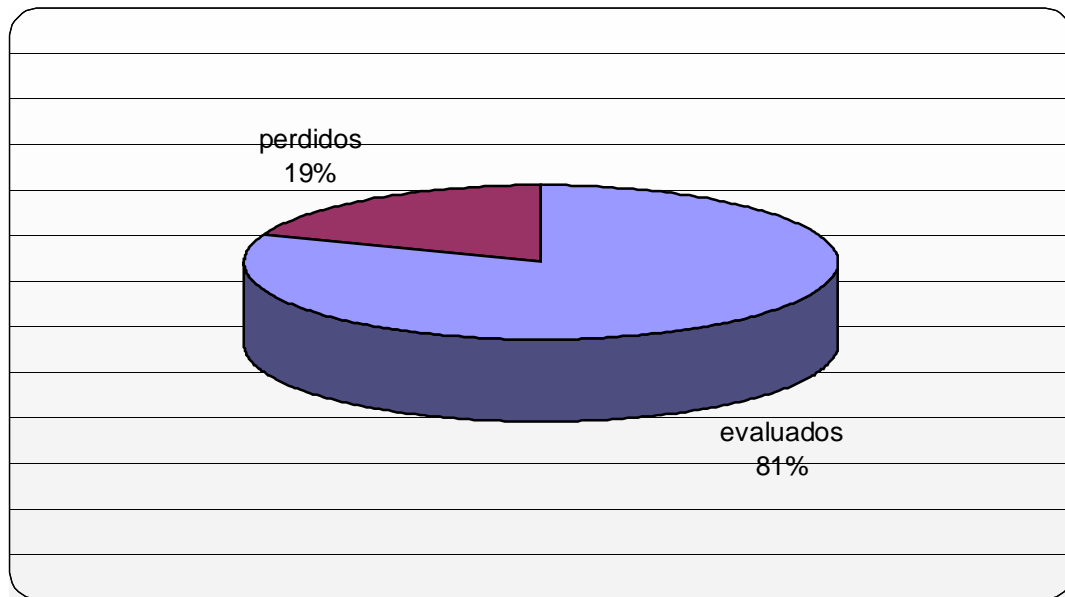
Después de realizados los procedimientos técnicos correspondientes al manejo de cada grupo se observó una pérdida de ovocitos en el grupo tratamiento, como resultado de fractura de zona pelúcida (20/156), desintegración total de los ovocitos (5/156) y pérdidas asociadas al procedimiento de descongelación (5/156). En el grupo Control se produjeron pérdidas asociadas a los procesos involucrados en la fijación de los ovocitos (5/137).

Los porcentajes de pérdida de ovocitos obtenidos en ambos grupos se especifican en la tabla 1 y Figura 1.

Tabla 1. Porcentaje de pérdida de ovocitos durante los procedimientos de maduración *in vitro* y vitrificación por el método Open Pulled Straw (OPS)

Grupo	Ovocitos madurados (n)	Ovocitos perdidos n, (%)
OPS	156	30 (19)
Control	137	5 (4)

Grafico N°1. Porcentaje de Pérdida durante el proceso de vitrificación por el método Open Pulled Straw (OPS) y descongelación de ovocitos.



Tasa de Maduración *in vitro*

Las características de estado nuclear de los ovocitos evaluados en ambos grupos se muestran en la tabla 2 y Figuras 2y 3. El porcentaje de ovocitos en estado de MI fue mayor en el grupo tratamiento que en el grupo control (39.7 v/s 12.1%), encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$).

El porcentaje de ovocitos degenerados fue de 23 y 13.6% para los grupos tratamiento y control respectivamente, observándose diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0.05$).

Finalmente posterior a la vitrificación por el método OPS, el número de ovocitos en estado de M II disminuyó en el grupo tratamiento respecto al grupo control. En este último la tasa de maduración nuclear alcanzó un 74.2% en comparación al 37.3% obtenido en el grupo tratamiento, observándose diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 2. Características de estado nuclear post descongelación en ovocitos posterior a los procedimientos de maduración *in vitro* y vitrificación por el método Open Pulled Straw (OPS).

Grupo	Ovocitos evaluados	Ovocitos MI n (%)	Ovocitos MII n (%)	Ovocitos degenerados n (%)
OPS	126	50 (39.7) a	47(37.3) a	29 (23.0) a
Control	132	16 (12.1) b	98 (74.2) b	18 (13.6) b

a, b: Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Grafico N°2. Porcentaje de ovocitos en distintos estados nucleares posterior a la maduración *in vitro* y vitrificación por el método Open Pulled Straw (OPS).

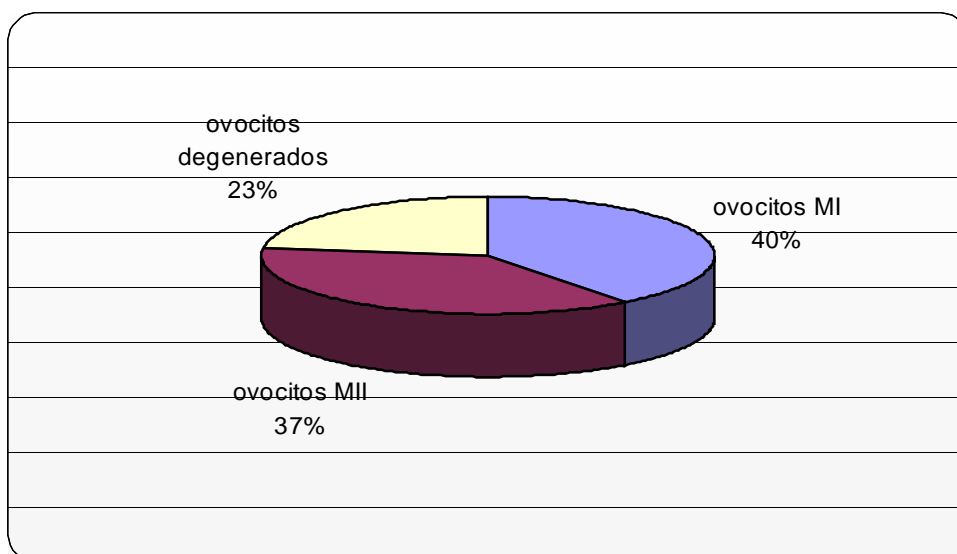
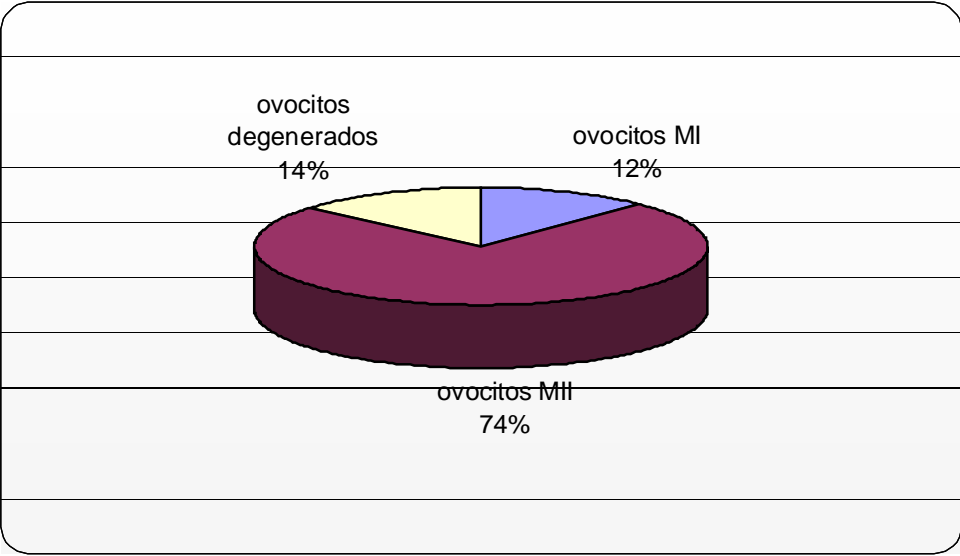


Grafico N°3. Porcentaje de ovocitos en distintos estados nucleares posterior a la maduración *in vitro* en el grupo Control.



DISCUSION

Los resultados obtenidos en este estudio apoyan lo señalado por distintos autores, quienes indican que es factible el uso de la vitrificación como método de criopreservación de ovocitos bovinos madurados *in vitro* (Fuku y col., 1992, Hamano y col., 1992, Arav y col., 1993, Hochi y col., 1998, Otoi y col., 1998, Papis y col., 2000, Arav y col., 2000). Por otra parte corrobora los resultados de otros autores quienes demuestran la factibilidad de vitrificar ovocitos por el método Open Pulled Straw (Martino y col., 1996 Vajta y col., 1998, Le Gal y Massip, 1999, Hurtt y col., 2000, Le Gal y col., 2000, Men y col., 2002, Vieira y col., 2002).

Porcentaje de pérdida de ovocitos

En lo que refiere a porcentaje de pérdida de ovocitos durante el procedimiento de vitrificación, no existen muchos reportes que mencionen este parámetro, por consiguiente no podemos realizar comparación con otros autores. Sin embargo, en dos reportes se mencionan las pérdidas relacionadas al congelar/descongelar embriones por vitrificación tradicional y por el método OPS. Así, Ratto y col. (1998) reportan una tasa de pérdida de 20% al descongelar pajuelas que contenían blastocistos bovinos vitrificados en forma tradicional. Por otra parte, Silva y Berland (2004) encontraron una tasa similar al 19% encontrado en nuestro trabajo, los autores reportaron un 11% de pérdida embrionaria al vitrificar blastocistos bovinos producidos *in vitro* por el método OPS, sugiriendo que probablemente puede ser disminuida con un manejo más acabado de la técnica por parte de los operarios.

Cuando se recuperan embriones y/o ovocitos criopreservados desde nitrógeno líquido (LN2), ocasionalmente se encuentran agrietados. Esta lesión física se piensa que es causada por un cambio no uniforme en el volumen de la solución durante el rápido

cambio de fase entre líquido y sólido, y es llamada daño por fractura (Rall y Meyer 1989). Kasai y *col.* (1996) determinando el daño ocasionado por fractura de zona pelúcida post vitrificación de embriones de ratón, demostraron que este tipo de daño ocurre durante el enfriamiento y calentamiento de los embriones lo que se puede prevenir con el uso de tasas de enfriamiento y calentamiento más lentas. Además concluyeron que la vitrificación, el descongelamiento y las fluctuaciones de temperatura *per se* no afectan la sobrevivencia de los embriones.

El porcentaje de pérdida de ovocitos debido a fractura de zona pelúcida obtenido en este trabajo (12.8%) es superior al encontrado por Silva y Berland (4.8%) (2004) e inferior al encontrado por Dhali y *col.* (2000) quienes al vitrificar ovocitos de búfalo observaron altos porcentajes de fractura (77%). Por último, los valores de fractura de zona pelúcida reportados en trabajos de vitrificación con el método de OPS son bajos. Así, Vatja y *col.* (1997) vitrificando embriones bovinos producidos *in vitro* de 4, 8,16 células reportan un 1% de fractura de zona pelúcida. Incluso existen reportes en la literatura que no registran daño de esta estructura al vitrificar embriones bovinos producidos *in vitro* (Vatja y *col.*,1998) donde los signos de fractura de zona o fractura de embriones no se detectaron durante el calentamiento, concluyéndose que el método OPS produce menos peligro de fractura de ovocitos/embriones al congelamiento y calentamiento comparativamente con otras técnicas de criopreservación, debido a las mayores tasas de congelación y descongelación utilizadas (Vatja y *col.*,1998).

Tasa de maduración *in vitro*

Debido a que en la mayor parte de los trabajos elaborados con anterioridad al nuestro, se evalúa la eficacia de la congelación de ovocitos de acuerdo a las tasas de segmentación de cigotos y tasa de producción de blastocistos, no es fácil hacer comparaciones con los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Inclusive, Hamano y *col.*

(1992) recomiendan que la mejor prueba es evaluar la capacidad de los embriones derivados de ovocitos criopreservados para el desarrollo de una descendencia viable. Sin embargo, en un estudio previo (Hurtt y col., 2000) se encontró que las tasas de maduración obtenidas de ovocitos bovinos vitrificados por el método OPS no difirieron entre los grupos tratamiento (ovocitos vitrificados a las 24 h de maduración) y control (ovocitos madurados por 24 h), siendo estas de 70 y 77 % respectivamente. Por otra parte, Vajta y col. (1998), quienes utilizaron el mismo procedimiento de vitrificación que en nuestro trabajo, señalan que la tasa de desarrollo embrionario obtenida con ovocitos vitrificados/descongelados es significativamente menor al grupo control (25 v/s 48 %).

En nuestro estudio la tasa de ovocitos en estado M II fue significativamente menor en el grupo criopreservado versus el control (37,3 y 74,2 % respectivamente). Esta diferencia podría deberse a una interrupción entre las comunicaciones existentes entre el ovocito y las células del cumulus. Como es sabido las células de la corona radiata extienden sus procesos citoplasmáticos hacia la ZP y terminan en dilataciones bulbosas estrechamente asociadas con la membrana del ovocito. Las células del cumulus y las células de la corona radiata se comunican entre ellas por uniones gap otorgando la impermeabilidad a la membrana del ovocito y permitiendo el paso de pequeñas moléculas (rol nutritivo) entre las células del cumulus (Gordon, 1994), estas uniones gap permanecen durante todo el proceso de maduración (Sutovsky y col., 1993). Existe evidencia consistente que la maduración meiótica involucra dos vías de interacción entre las células del cumulus y el ovocito bovino. Allworth y Albertini (1992, 1993) afirman fuertemente que la maduración *in vitro* del ovocito bovino involucra modificaciones en el citoesqueleto de las células del cumulus que podrían regular el inicio, la progresión y termino de la maduración del ovocito.

El efecto benéfico de las células del cumulus en la maduración del ovocitos ha sido estudiado en ganado bovino (Fukui y Sakuma, 1980; Crister y col., 1986 a,b; Lutterbach y

col., 1987; Faundez y col., 1988; Chikamatsu y col., 1989; Fukui y Ono. 1989; King y col., 1990; Fassi-Fihri y col., 1991; Mochisuki y col., 1991 a, b; Cox y col., 1993; Suh y col., 1993), en cerdos (Park y col., 1990); en ovejas (Wahid, 1993) y en ratas (Vanderhiden, 1989; Vanderhiden y Armstrong, 1989). Estudios realizados por Chian y Niwa (1994) demuestran que la presencia de las células del cumulus intactas al menos por 12 h son necesarias para una maduración normal del citoplasma de ovocitos bovinos.

Diversos estudios demuestran que la remoción de las células del cumulus previo a la maduración del ovocito bovino resulta en una reducción significativa en la capacidad de desarrollo de los ovocitos, esta reducción es proporcional al grado de remoción de estas células, produciéndose un daño de las uniones gap por la remoción de las células del cumulus (Shi, 1991; Im y col., 1997). La misma relación ha sido descrita en ovocitos equinos vitrificados, donde la disminución en la viabilidad de los ovocitos, se atribuye a la destrucción de las conexiones de las células del cumulus y a la ruptura parcial de las mitocondrias (Hochi y col.1994).

La extracción parcial de las células del cumulus se realiza debido a que este paso puede facilitar la penetración del crioprotector mientras que se mantiene el papel de apoyo de las células que permanecen adheridas al ovocito en la subsiguiente maduración final, fecundación y el desarrollo embrionario posterior (Massip, 2003). En el presente estudio la denudación de los ovocitos, 6 horas después de iniciada la maduración *in vitro*, se realizó mediante un pipeteo suave utilizando pipetas de vidrio de un diámetro ajustado al tamaño del ovocitos y su cumulus adyacente, debido a que la utilización de una pipeta automática de 1000 μ l no efectuó la denudación requerida en forma eficiente. Debido a esto, se pudo haber removido en exceso las células del cumulus que rodean al ovocito, lo cual fue evidente en varios de los ovocitos vitrificados. El daño ocasionado a los CCO por la denudación mecánica podría explicar el aumento de ovocitos en estado M I, el cual se hace evidente entre las 10.3-15.4 (Sirard y col. 1989) y las 12 h (Hochi y col. 1998), de

reiniciado la maduración debido a que se interfirió con el desarrollo de la meiosis, lo que derivó en una disminución de los ovocitos en M II respecto al grupo control. Además los ovocitos se vitrificaron a las 22 h de la maduración y como lo confirman Sirard y *col.* (1989) y Hochi y *col.* (1998) el ovocito alcanza el estado de M II entre las 18-24 y 24 h, respectivamente.

CONCLUSION

- ✓ La vitrificación por el método de pajuela abierta (Open Pulled Straw) de ovocitos bovinos madurados *in vitro* disminuye significativamente las tasas de metafase II obtenida post descongelación en comparación con ovocitos no vitrificados.

BIBLIOGRAFIA

AGCA, Y., J. LUI, A.T. PETER, E.S CRISTER, J.K. CRISTER. 1998. Effects on developmental stage of bovine oocytes plasma membrane water and cryoprotectant permeability. *Mol Reprod Dev*, 49: 408-415

AL HANSI, A, J. KIRSH, K. DIEDRICH, S. BLANKE, H. VEN VANDER, D. KREBS. 1989. Successful embryo transfer of cryopreserved and in vitro fertilized rabbit oocytes. *Hum Reprod*, 4: 77-79.

ALLWORTH, A.E., D.F. ALBERTINI.1992. Cytoskeletal reorganization in bovine cumulus oocyte complexes in maturation associated. *Biology of Reproduction*, 46 (Suppl.1), 139. (Abs.353)

ALLWORTH, A.E., D.F. ALBERTINI.1993. Meiotic maturation in cultured bovine oocytes is accompanied by remodeling of the cumulus cells cytoskeleton. *Developmental Biology*, 158: 101-112.

AMAN, R.R, J.E. PARKS. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 50: 103-110.

ARAV, A, D. SHEHU, M. MATTIOLI. 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, 99: 353-358.

ARAV, A., Y. ZERON; S.B. LESLIE, E. BEHBOODI, G.B. ANDERSON, J.H. CROWE. 1996. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology* 33, 589-599.

ARAV, A, Y. ZERON.1997. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology*, 47:341.

ARAV, A, Y. ZERON, A. OCHERETNY.2000. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 53: 248. Abstract.

CHEN, C. 1986. Pregnancy after human oocytes cryopreservation. *Lancet*, 2 884-886

CHEDID, S, E. VAN DEN ABBEEL, A. VAN STEIRTEGHEM. 1992. Effects of cryopreservation on survival and development of interphase-and mitotic stage 1-cell mouse embryos. *Human Reproduction* 7, 1451-1456.

CHIAN, R.C., K. NIWA. 1994. Effects of cumulus cells present during different periods of culture on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology*, 41:176.

CHIKAMATSU, N., M URAKAWA, Y. FUKUI, Y. AOYAGY, H. ONO. 1989. In vitro fertilization and early development of bovine follicular oocytes matured in different cultured

systems and inseminated with spermatozoa treated by different methods. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 35:154-158.

COX, J. F. J. HORMAZABAL, A. SANTA MARIA. 1993. Effects of the cumulus cells on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*, 40: 1259-1267.

CRISTER, E.S., M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE, N.L. FIRST. 1986a. Influence of cumulus cells association during in vitro maturation of bovine oocytes on embryonic development. *Biology of Reproduction*, 34 (Suppl. 1) 286. Abs.

CRISTER, E.S., M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE, W.H. EYESTONE, D.L. NORTHEY, N.L. FIRST . 1986b. Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. *Theriogenology*, 25: 150.

DHALI, A., R. MANIK, S. DAS, S. SINGLA, P. PALTA. 2000. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology*, 53: 1295-1303.

DOBRINSKY, J. R. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45, 17-26.

DOBRINSKY, J. R. 2002. Advancements in criopreservation of domestical animal embryos. *Theriogenology*, 57 (1): 285-302

FASSI-FIHRI, N., D. CHUPIN, B. MARQUANT-LE GUINNE, M. THIBIER. 1991. Critical effects of granulosa cells from preovulatory follicles on IVM, IVF and embryonic development in cattle. *Theriogenology*, 35: 198.

FAUNDEZ, R., I SPOHR, Z. BORYCZKO. 1988. Effect of follicle cells on maturation and in vitro fertilization of cattle oocytes. *Proceedings of the Eleventh International Congress on Animal Reproduction and artificail Insemination*. (Dublin) 3, 325, (3pp.)

FUKU, E, T. KOYIMA, Y. SHIOGA, G. J. MARCUS, B.R. DOWNEY. 1992. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*. 29: 485-492

FUKUI, Y., Y. SAKUMA. 1980. Maturation of bovine oocytes cultures in vitro in relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biology of Reproduction*, 22: 669-673.

FUKUI, Y., H. ONO. 1989. Effects of sera hormones and granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *Journal of reproduction and Fertility*, 86: 501-506.

GORDON, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB. International. Irlanda. pp. 639.

HAMANO, S, A. KOKEIDA, M. KUWAYAMA, T. NAGAI. 1992. Full term development of in vitro matured, vitrified, and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 38: 1085-1090.

HOCHI, S., T. FUJIMOTO, Y. CHOI, J. BRAUN, N. OGURY. 1994. Cryopreservation of equine oocytes by 2-step freezing. *Theriogenology*, 42: 1085-1094.

- HOCHI, S, K. ITO, M. HIRABAYASHI, M. UEDA, K. KIMURA, A. HANADA. 1998. Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. *Theriogenology*, 49: 787-796.
- HURTT. A., F. LANDIM-ALVARENGA, G. SEIDEL, Jr, E. SQUIRES. 2000. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open pulled straws. *Theriogenology*, 54: 119-128.
- IM, K.S., J.K. KANG, H.S. KIM. 1997. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen thawed bovine oocytes. *Theriogenology*, 47: 881-891.
- JACKOWSKY, S., S.P LEIBO, P. MAZUR. 1980. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. *J. Exp. Zool.* 211: 329-341.
- JOHNSON, M.H, S.J. PICKERING. 1987. Effects of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development* 100: 313-324
- KASAI,M., ZHU S.E, PEDRO PB, NAKAMURA K, SAKURAI T, EDASHIGE K. 1996. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology*, 33:459-64.
- KING, R.S., T.L. McNUTT, M.A. HENAULT, K. KILLIAN. 1990. Effect of cumulus oophorus and follicular cells on meiotic maturation on bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 42 (Suppl. 1), 91.
- KUBOTA, C, X.YANG, A. DINNYES, J. TODOROKY, H. YAMAKUCHI, K. MIZOSHITA, S. INOHAE, N. TABARA. 1998. In vitro and in vivo survival of frozen thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev* 51: 281-286.
- LAZAR, L., J. SPAK, V. DAVID. 2000. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the Open Pulled Straw method. *Theriogenology* 54, 571-578.
- LE GAL, F. Y A. MASSIP. 1999. Cryopreservation of cattle oocytes: Effects of meiotic stage, cyclohexamide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology* 38: 290 – 300.
- LE GAL, F, R. DE ROOVER, B. VERHAEGHE, D. ETIENNE, A. MASSIP. 2000. Development of vitrified matured cattle oocytes after thawing and cultured in vitro. *Vet Rec.* 146: 469-471.
- LEWIS, I.M, M.W. LANE, , G. VAJTA. 1999. Pregnancy rates following transfer of in vitro produced bovine embryos vitrified by the Open Pulled Straw (OPS) method. *Theriogenology*, 51, 168.
- LIM, J.M, Y. FUKUI, H. ONO. 1992. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen thawed bovine oocytes. *Theriogenology*, 37: 351-361.

- LUNA, H.S, I. FERRARI, R. RUMPF. 2001. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. *Anim Reprod Sci*, 68: 23-28.
- LUTTERBACH, A., R.A KOLL, G. BREM.1987. In vitro maturation of bovine oocytes in coculture with granulosa cells and their subsequent fertilization and development. *Zuchthygiene*, 22: 145-150.
- MARTINEZ, A.G., M. MATKOVIC.1998. Cryopreservation of ovine embryos flow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 49: 1039-1049.
- MARTINO, A., J. POLLARD, S. LEIBO. 1996. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol Reprod Dev*, 45 : 503-512.
- MASSIP, A, O.P VAN DER ZWALMEN, .F. ECTORS. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*; 27, 69-79.
- MASSIP, A. 2003. Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. *Reprod. Nutr. Dev.* 43: 325-330.
- MAZUR, P. 1977. Slow-freezing injury in mammalian cells. En: The freezing of mammalian embryos. Ciba Found. Symp. 52 (new series). Elsevier, Exeperta Medica. North-Holland. Amsterdam. pp. 19-48.
- MEN, H., R.L. MONSON, J.J. RUTLEEDGE. 2002. Effect of meiotic stages and maturation protocols of bovine oocytes's resistance to cryopreservation. *Theriogenology*, 57: 1095-1103.
- MOCHIZUKY, H., Y. FUKUI, H. ONO. 1991a. Effect of number of granulosa cells added to cultured medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 36: 973-986.
- MOCHIZUKY, H., Y. FUKUI, K. OOSAKI, H. ONO. 1991b. Effect of number of granulosa cells added to cultured medium for in vitro maturation and fertilization and development of bovine oocytes. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 37: 263-271.
- MOORE, N.W., R.J. BILTON. 1977. Frozen storage of embryos of farm animals: progress and implications. In The freezing mammalian embryos (Ciba foundation symposium 52) Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 203-219.
- NIEMAN,H., B. SACHER, E. SCHILLING, D. SMIDT.1982. Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrosa for glicerol dilution after a fast freezing and thawing method. *Theriogenology*, 17: 102. Abstr.
- OTOI, T, S. TASHIKAWA, S. KONDO, T. SUZUKY. 1993. Developmental capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants. *Theriogenology* 40: 801-807.
- OTOI, T, K. YAMAMOTO, N. KOYAMA, SUZUKY, T. 1995. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology*, 32: 455-460.

OTOI, T., K. YAMAMOTO, N. KOYAMA, S. TASHIKAWA, M. MURAKAMI, Y. KIKKAWA , T. SUZUKY. 1996. A frozen- thawed *in vitro*- matured bovine oocyte derived calf with normal growth and fertility. *J. Vet. Med. Sci.* 58 (8); 811-813.

OTOI, T., K. YAMAMOTO, N. KOYAMA, S. TASHIKAWA, T. SUZUKY. 1997. Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. *Cryobiology*, 34, 36-41

OTOI, T., K. YAMAMOTO, N. KOYAMA., S. TACHIKAWA, T. SUZUKI. 1998. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology*, 37: 77-85.

PLASZ, A.T., Y R.J. MAPLETOF.1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotecnol. Adv.* 14: 127-149.

PLASZ, A.T Y M. DEL CAMPO. 1995. Crioconservación de oocitos y embriones de mamíferos: recientes avances. Primer curso internacional sobre transferencia y congelación de embriones bovinos. Universidad de Córdoba, Colombia y Universidad de Saskatchewan, Canadá. Montería, Colombia. 137-163.

PARK, S. B., H. K PARK, A. IRITANI. 1990. Maturation and fertilization of porcine follicular oocytes cocultured with granulosa cells during *in vitro* culture. *Korean Journal of Animal Sciences*, 32: 15-19.

PARKS, E., N. RUFFING. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37, 59-73.

PAPIS, K., M. SHIMIZU, Y. IZAIKE. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, 54: 651-658.

RALL, W.F., G.M. FAHY.1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature (London)* 313: 573-575.

RALL, W.F., T.K. MEYER. 1989. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*, 31: 683-692.

RATTO, M., BERLAND, M., WOLTER, M., SILVA, M. y MATAMOROS, R.. 1998. Vitrificación de embriones bovinos: Antecedente preliminar. Arch. Med. Vet., XXX, N° ext. p. 187-188.

SAUNDERS, K.M., J.E. PARKS. 1999. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro* matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 61: 178-187.

SAHA, S., R. RAJAMAHENDRAN, A. BOEDIONO, C. SUMANTRI, T. SUZUKI. 1996. Viability of bovine blastocysts obtained after 7,8 o 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step dehydration. *Theriogenology*, 46, 331-343.

SATHANANTHAN, A., A. TROUNSON, A. WOOD. 1986. Atlas of fine structure of human sperm penetration, eggs and embryos cultured *in vitro*. Preager, New York, 1-132.

SATHANANTHAN,A., A. TROUNSON, L. FREEMAN. 1987. Morphology and fertilizability of frozen human oocytes. *Gamete Res.* 16: 343-354.

SHAW, J.M., A.O. TROUNSON. 1989. Parthenogenetic activation of unfertilized oocytes by exposure to 1-2 propanediol is influenced by temperature, oocyte age, and cumulus removal. *Gamete Res.* 24 : 269-279

SHI, D.S. 1991. Studies related to factors affecting the yield of bovine embryos produced by in vitro techniques. PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin.

SILVA, M., M. BERLAND. 2004. Vitricación exitosa con el método Open Pulled Straw (OPS) de blastocistos bovinos producidos in vitro: Primer reporte. *Arch. Med. Vet.* XXXVI

SIRARD, M.A., H.M. FLORMAN, M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE, F.L BARNES, M-L SIMS, N.L FIRST. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 40: 1257-1263.

SUH, T.K., N. REHMAN, A. COLLINS, R.W WRIGHT. 1993. Effects of granulosa cells from different size follicles in co-culture with bovine oocytes on maturation, fertilization and cleavage. *Theriogenology*, 39: 323.

SUTOVSKY, O., J.E. FLECHON, B. FLECHON, J. MOTLIK, N. PEYNOT, P CHESNE, Y. HEYMAN. 1993. Dynamic changes of gap junction and cytoskeleton during in vitro culture of cattle oocytes cumulus complex. *Biology of Reproduction*, 49: 1277-1287.

VAJTA, G.; P.J. BOOTH; P. HOLM; M. KUWAYAMA; P.J. BOOTH; T. GREVE y H. CALLESEN. 1997. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-letter* 18: 191 – 195.

VAJTA,G., P. HOLM, M. KUWAYAMA, P.J, BOOTH, H. JACOBSEN,T. GREVE , H. CALLESEN. 1998. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53-58

VAJTA,G., N. RINDOM, T.T. PEURA, P. HOLM, T. GREVE Y H. CALLESEN. 1999. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 52: 939-948.

VAJTA,G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science.* 60-61:357-364.

VANDERHYDEN, B.C. 1989. Studies on the regulation of oocytes maturation in the rat with assesment by in vitro fertilization and fetal development. *Dissertation Abstracts International B, Science and Engineering*, 49: 3622-3623.

VANDERHYDEN, B.C., D.T. AMSTRONG. 1989. Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization and subsequent development of rat oocytes. *Biology of Reproduction*, 40: 720-728.

VAN UEM J.F., E.R. SIEBZEHRUBL, B. SCHUH, R. KOCH, S. TROTROW, N. LANG. 1987. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet*, 2: 752-753.

VAN SOOM A., S. TANGHE, I DE PAUW, D. MAES, A .DE KRUIF. 2002. Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 144-151.

VICENT, C., V. GANIER, Y. HAYMAN, J.P. RENARD. 1989. Solvent efforts and cytoskeleton organization and in vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fertil*, 87: 809-820.

VICENT, C., S. PICKERING, M. H. JOHNSON. 1990. The hardening effect of DMSO on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *J. Reprod. Fertil*, 89: 253-260.

VIEIRA, A., A. MEZZALIRA, D. BARBIERI, R. LEHMKUHL, M. RUBIN, G. VAJTA. 2002. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, 45: 91. Abstract

WAHID, H. 1993. Studies related to the in vitro production of sheep embryos. PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin

WASSERMAN, P.1988 The mammalian ovum. In: Knobil, E y Neill, J. (eds). *The Physiology of reproduction*. Raven press, New York, Vol 1, 69-102

WHITTINGHAM. D.G, S.P LEIBO, P. MAZUR. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196° C and -269° C. *Science*, 178:411-414.