

UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO
FACULTAD DE ACUICULTURA Y CIENCIAS VETERINARIAS
Escuela de Medicina Veterinaria



**EVALUACION DE SOBREVIVENCIA POST DESCONGELACION DE
BLASTOCISTOS BOVINOS VITRIFICADOS CON DOS METODOLOGIAS.**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Ciencias Veterinarias.

RENATO FERNANDO GUTIERREZ PINHEIRO

Temuco

Chile

2004

PROFESOR PATROCINANTE:

Prof. Mauricio Silva J.

PROFESOR INFORMANTE INTERNO:

Prof. Marco Berland O.

PROFESOR INFORMANTE EXTERNO:

Prof. Alfonso Sánchez R.

PROFESOR INVITADO:

Prof. Mario Martínez D.

EXAMEN DE GRADO:

Temuco, 15 de Junio del 2004.

INDICE

Resumen	4
Summary	5
Introducción	6
Antecedentes Generales	8
Hipótesis	15
Objetivos	16
Material y Método	17
Resultados	25
Discusión	28
Conclusión	35
Bibliografía	36
Anexo N°1	40
Anexo N°2	42

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la sobrevivencia *in vitro* post descongelación de blastocistos bovinos producidos *in vitro* y vitrificados por dos metodologías.

Blastocistos bovinos fueron producidos mediante la maduración de ovocitos, la fecundación de los mismos y el co-cultivo *in vitro* de los cigotos resultantes con células oviductales, por un período de 7 a 8 días.

Un total de 122 blastocistos expandidos bovinos producidos los días 7 y 8 de cultivo, fueron seleccionados para ser criopreservados mediante dos protocolos de vitrificación. Un grupo de blastocistos (56) fueron vitrificados mediante el método Open Pulled Straw (OPS, pajueta abierta), el que empleó el Etilenglicol 20% y Dimetilsulfóxido 20% como crioprotectores. El otro grupo de embriones (63) fue criopreservado utilizando un protocolo de vitrificación a pajueta sellada, el cual empleó como crioprotectores el Etilenglicol 20%, Glicerol 20%, Polietilenglicol 0,3%, Sucrosa 0,3% y Xilosa 0,3%. Una vez descongelados los blastocistos de ambos grupos fueron cultivados *in vitro*, en grupos de máximo 3 blastocistos, evaluándose su re-expansión a las 24 y su tasa de eclosión a las 72 horas de cultivo post descongelación. El cultivo consistió en medio TCM – 199 adicionado con 20% de Suero de Ternero y 0,1 mM de β -Mercaptoetanol. Las condiciones generales de cultivo fueron 38,5° C, 5% CO₂, y una atmósfera saturada de humedad. Las comparaciones entre ambos grupos se realizaron mediante la prueba estadística de Chi-cuadrado aplicándose el índice de corrección de Yates y utilizando un nivel de significancia del 5%.

Un total de 108 Blastocistos fueron recuperados post descongelación, de los cuales 54 provenían del método de vitrificación a pajueta abierta y los 54 restantes de la técnica de vitrificación a pajueta sellada. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) en las tasas de re-expansión *in vitro* post descongelación entre ambos métodos de vitrificación, observándose un 50% (27/54) y 72,2% (39/54) para los blastocistos criopreservados mediante vitrificación a pajueta sellada y pajueta abierta, respectivamente. También se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) entre las tasas de eclosión *in vitro* a las 24 horas post descongelación, observándose un 1,8% (1/54) y 22,2% (12/54) para los embriones criopreservados mediante vitrificación a pajueta sellada y pajueta abierta, respectivamente. Finalmente, la tasa de eclosión *in vitro* a las 72 horas de cultivo post descongelación fue de 63% (34/54) y 18,5% (10/54) para los embriones criopreservados a pajueta abierta y pajueta sellada respectivamente, siendo estas diferencias estadísticamente significativa ($P < 0,01$).

De acuerdo a estos resultados se puede concluir que las tasas de re-expansión y de eclosión post descongelación de blastocistos bovinos vitrificados a pajueta abierta son mayores a las de blastocistos vitrificados mediante vitrificación a pajueta sellada.

Palabras Clave: Embriones bovinos, *in vitro*, criopreservación, Open Pulled Straw, Vitrificación.

SUMMARY

The main purpose of the present investigation was to evaluate post thawing *in vitro* survival of bovine blastocysts produced *in vitro* and vitrified by two different methodologies.

Bovine blastocysts were produced by oocytes maturation, fertilization and *in vitro* co-culture of the resulting zygotes with oviductals cells, for a period of 7 to 8 days.

A total of 122 expanded blastocysts produced the days 7 and 8 of culture, were selected to be cryopreserved by two protocols of vitrification. A group of blastocysts (56) were vitrified by Open Pulled Straw (OPS) method using Etylene glycol 20% and Dimetylsulfoxid 20% as crioprotectors. The second group of embryos (63) was criopreserved using a traditional vitrification protocol (sealed straw), which used Etylene glycol 20%, Glycerol 20%, Polietylenglycol 0,3%, Sucrose 0,3% and Xilose 0,3% as crioprotectors. Once thawed blastocysts of both groups were cultured *in vitro*, in groups of maximum 3 blastocysts. The post thaw culture medium consist on TCM - 199 added with 20% calf serum and 0,1 mM β -Mercaptoetanol. The general conditions of culture were 38,5 °C, 5% CO₂, and a saturated atmosphere of humidity. Re expansion was evaluated at 24 of culture and hatching rate at 72 hours of post thawing culture. Comparisons between both groups were carried out by means of the statistical test of Chi-square applying the index of correction of Yates and using a level of significance of 5%.

A total of 108 blastocysts were recovered post thawing, of which 54 came from the OPS method and the remaining 54 from the sealed straw technique. Statistically significant differences ($P < 0,05$) were observed in the post thawing re-expansion rates between both vitrification methods, recording a re expansion rate of 50% (27/54) and 72,2% (39/54) for blastocysts cryopreserved by sealed straw method and OPS, respectively. Statistically significant differences ($P < 0,01$) were also observed among hatching rates at 24 hours post thawing, recording a 1,8% (1/54) and 22,2% (12/54) for the embryos cryopreserved by sealed straw method and OPS, respectively. Finally, hatching rate at the 72 hours of post thawing culture was 63% (34/54) and 18,5% (10/54) for the embryos cryopreserved by OPS method and by sealed straw method respectively, being these differences statistically significant ($P < 0,01$).

According to these results we can conclude that the post thawing re-expansion and hatching rates of *in vitro* produced bovine blastocysts vitrified by OPS method are higher than those of blastocysts vitrified by sealed straw method.

Key words: Bovine embryos, *in vitro*, cryopreservation, Open Pulled Straw, Vitrification.

INTRODUCCIÓN

A pesar de que las temperaturas de congelación generalmente son letales para la gran mayoría de células eucariontes y procariontes, la criopreservación de embriones a sido utilizada como una herramienta exitosa para la comercialización de la genética autóctona de cada país, como es el caso de animales bovinos de producción cárnica o lechera provenientes de otros continentes. Hoy en día se hace más fácil el transporte de dicho material genético, ya que hasta hace un par de décadas el ingreso de nuevas razas a un país determinado se hacia en base a animales en pie, lo que implica un resguardo durante la cuarentena sanitaria de ingreso y la posibilidad de pérdidas durante el traslado, entre otras. Actualmente gracias a la criopreservación de embriones, los problemas anteriormente señalados, pasan a ser sólo un recuerdo, debido a que el transporte de material genético se ve optimizado por la reducción del volumen individuo-superficie, demostrado en el área que ocupa un estanque de nitrógeno líquido capaz de almacenar cientos de embriones.

Con los avances de la biotecnología, la criopreservación de embriones ha crecido de la mano de la producción y la transferencia embrionaria. Es así, que desde la primera congelación exitosa de un embrión mamífero obtenido *in vitro*, realizado hace más de 30 años, han surgido innumerables técnicas desarrolladas con el fin de preservar embriones con los mínimos efectos nocivos sobre su reactivación enzimática intracelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc. Para ello, científicos han ido en búsqueda de protocolos cada vez

más simplificados para disminuir el stress que significa someter a los embriones a temperaturas extremadamente bajas, donde se reduce drásticamente la actividad fisiológica de las células embrionarias y obtener así resultados satisfactorios.

Uno de los principales objetivos de la criopreservación de embriones, es la de conservar el 100% del material genético de un individuo, en comparación con la criopreservación de gametos, que sólo lo hace en un 50%. Esto resulta importante en la práctica, ya que los resultados esperados desde el punto de vista productivo, son obtenidos en el corto plazo con el nacimiento de la cría transferida y no es necesaria la espera de la mejora genética del plantel local, que se obtiene después de años de cruza dirigidas o planes de inseminación artificial.

ANTECEDENTES GENERALES

Congelación Tradicional.

La congelación se define como un proceso físico-químico complejo, de intercambio de calor y agua entre las células y el medio externo, que culmina en un cambio de una fase líquida a una sólida (Schneider y Mazur, 1984). Los embriones son congelados y descongelados de manera rápida, lo que hace necesario deshidratarlos parcialmente antes de la congelación, con el fin de evitar la formación de cristales que lesionan los blastómeros (Mazur, 1977). La deshidratación se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación (Schneider y Mazur, 1986).

La tasa de enfriamiento a la que son sometidas las células, afecta de manera directa la respuesta celular a temperaturas por debajo de cero grados centígrados. De acuerdo con lo anterior, al utilizar tasas de enfriamiento muy lentas se produce lo que se conoce como efecto solución. Al iniciarse el descenso de la temperatura, comienza a formarse hielo extracelular, con la consecuente concentración de sales, lo que provoca disminución del volumen celular y destrucción de la membrana plasmática. En el caso contrario, al tener una tasa de enfriamiento muy rápida, el agua no alcanza a salir del interior de la célula y se produce el hielo intracelular (Cabodevilla y Teurel, 2001).

Algunos crioprotectores como glicerol (G), dimetilsulfoxido (DMSO), etilen glicol (EG), polivinil pirrolidona (PVP) y sucrosa son utilizados como sustancias

protectoras contra el congelamiento. PVP y sucrosa son empleados como agentes deshidratantes del agua intracelular libre, mediante la diferencia de la presión osmótica entre el medio intra y extracelular, pero con la característica de ser impermeable a la célula. Por otro lado, G, DMSO y EG también extraen el agua intracelular mediante la diferencia de presión osmótica y además ingresan a la célula para ayudar en la protección del citoplasma. Estos crioprotectores previenen la deshidratación y degeneración proteica producida por el proceso de congelación de embriones. Además estos no serían tóxicos para los embriones.

Kanagawa y col. (1995) reportaron que existen cálculos para la tasa de congelación necesaria para la deshidratación ocurrida durante la congelación celular, mediante la aplicación de ecuaciones teóricas simultáneas; donde concluyó en sus cálculos la tasa de $1^{\circ} \text{C}/\text{min}$.

Las pajuelas son usualmente enfriadas abruptamente desde una temperatura ambiente hasta los 0°C y sembradas a los -4 y -7°C . Siembra es el término usado para describir la iniciación de la formación de hielo controlada. Ésta se induce al tocar la pajuela con una pinza enfriada directamente sobre el nitrógeno líquido (N_2L). Posterior a la siembra, se continúa la congelación a una tasa de $0,3^{\circ} \text{C}/\text{min}$ hasta llegar a los -35°C , donde los embriones son introducidos dentro del N_2L (Gordon, 1994).

Uno de los principales determinantes de la sobrevivencia de embriones bovinos durante la congelación es la tasa de enfriamiento. El resultado de un trabajo realizado en Cambridge (Willadsen, 1977), fue utilizado durante muchos años en la

práctica común de la congelación tradicional de embriones, usando una tasa cercana a los $0,3^{\circ}$ C/min. Por otra parte, Leibo (1988) concluyó que el máximo desarrollo de embriones bovinos suspendidos en Glicerol al 1,5 M se logra a una tasa de enfriamiento de $0,6^{\circ}$ C/min.

En la descongelación de embriones criopreservados tradicionalmente, varios han sido las investigaciones que han aportado en el éxito del proceso, es así como un estudio realizado por Rall y Meyer (1989), utilizaron la fractura de la zona pelúcida como guía para un apropiado proceso, es así como estos autores encontraron una baja incidencia de daños en la zona pelúcida cuando las pajuelas fueron temperadas al tomar contacto con el aire por 10 segundos previo a ser transferida al agua. El corto tiempo de exposición al aire permitió que la pajuela se temperara a una temperatura cercana a los -100° C previo a una rápida descongelación en el agua.

Para el control de las tasas de congelación anteriormente descritas, se hace imprescindible el uso de equipos con tecnología avanzada, los cuales mediante programas modificables establecidos por sus fabricantes, permiten el descenso controlado de la temperatura según cada protocolo.

Vitrificación y sus ventajas.

La vitrificación es un proceso de solidificación en el cual no existe la formación de cristales de hielo y por lo tanto no hay una concentración de los solutos como en la congelación tradicional; ocurre aquí un abrupto aumento de la

viscosidad del medio produciendo un sólido, condición semejante a un vidrio. La tasa de descongelación es rápida para evitar la formación de cristales cuando la temperatura retorna a la normalidad (Gordon, 1994).

El mérito de la vitrificación, se basa en la simplificación y rapidez en la operación del congelamiento, en términos de reducir el tiempo de congelación y el uso de equipos costosos requeridos para los programas de congelación tradicional (Gordon, 1994).

La vitrificación fue descrita como una técnica alternativa de criopreservación por los científicos Rall y Fahy (1985), quienes utilizaron una mezcla de solutos (DMSO, acetamida, propilen glicol). El proceso completo requirió cerca de 35 minutos, para permitir los pasos de equilibración antes de que los embriones fuesen dispuestos dentro del N₂L.

La vitrificación ha sido utilizada con éxito en la criopreservación de embriones de muchas especies mamíferas producidos tanto *in vivo* como *in vitro*. Es así como Dobrinsky y col. (1991) extrapolaron la técnica de vitrificación empleada para preservar embriones de ratas y conejos, para la vitrificación de embriones bovinos obtenidos por superovulación. Por otro lado también se han reportado muchos casos exitosos de vitrificación de embriones bovinos obtenidos *in vitro*. (Kasai y col., 1990; Kasai y col., 1991; Yang y col., 1992; Kuwayama y col., 1992).

Esta técnica cuenta con la ventaja de prescindir de equipos costosos y complejos para ejecutar tal proceso, ya que se emplea una pajuela convencional de

0,25 mL, la que es inmersa directamente al N₂L sin seguir una tasa de congelación constante.

Palasz y Mapletoft (1996), señalan que el método de vitrificación de embriones que emplea pajuelas de inseminación (de 0,25 mL) selladas e introducidas directamente al N₂L, presenta una tasa de congelación aproximada de 2.500° C/min. Por otra parte, Vajta y col. (1998a) 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.

En el ámbito local, se reportan algunos trabajos con resultados exitosos utilizando esta técnica, así Ratto y col. (1998) señalan en su trabajo de vitrificación a pajueta sellada de embriones bovinos obtenidos *in vivo*, una tasa de re-expansión del 63% y una tasa de eclosión del 33%, ambas obtenidas a las 72 horas post descongelación. Otros resultados exitosos son los entregados por Arteaga (2003), quien utilizando el protocolo de vitrificación a pajueta sellada descrito por Saito e Imai (1997), obtiene un 56,9% de sobrevivencia a las 24 horas de cultivo *in vitro* post descongelación de embriones bovinos producidos *in vitro*.

Open Pulled Straw (OPS, pajueta abierta) y sus ventajas.

El método de vitrificación que emplea pajuelas abiertas y estiradas, fue diseñado por un grupo de investigadores en Dinamarca, quienes hicieron los primeros reportes de vitrificación por este método, utilizando embriones de cerdo y

embriones bovinos producidos *in vitro* (Vajta y col. 1997) durante la segunda mitad de la década de los noventa.

La técnica de la pajuela abierta y estirada consiste en acelerar aún más la velocidad de congelación mediante la reducción del diámetro interno de la pajuela y del grosor de la pared de la misma, disminuyendo así, el volumen de medio a congelar y la barrera que interfiere entre el interior de la pajuela y el N₂L. Se disminuye así la crioinjuria, en comparación con resultados obtenidos con pajuelas convencionales (Vajta y col., 1998a).

El método de la pajuela abierta ofrece muchas ventajas sobre otras técnicas de criopreservación de embriones. La más importante es la alta tasa de congelamiento y descongelamiento, las cuales alcanzan valores de 20.000° C/min. (Vajta y col., 1998a). El proceso de carga y descarga de los embriones a las pajuelas es sencillo, además la descarga va acompañada inmediatamente de la dilución del crioprotector cuando la pajuela es descongelada. La única desventaja del proceso, es el contacto directo entre el embrión contenido en la solución crioprotectora y el N₂L, lo cual es un riesgo potencial de contaminación (Tedder y col., 1995).

Vajta y col. (1998a) reportaron que con la vitrificación a pajuela abierta 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 lograron disminuir el tiempo de exposición al N₂L de 75 a 90 segundos a sólo 45 – 60 segundos con el método a pajuela abierta. .

Por otra parte, a nivel local Soto (2003), señala que la vitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* mediante Open Pulled Straw (OPS, pajuela abierta) es factible, reportando un 57,4% de re-expansión a las 24 horas post descongelación y un 24% de eclosión *in vitro* a las 72 horas post descongelación.

HIPOTESIS

La vitrificación, al igual que otros métodos de crioconservación, afectan a los embriones obtenidos *in vitro* produciendo daño celular. Según los antecedentes reunidos, el daño celular producido al embrión por el método de vitrificación a pajuela abierta resulta menor en comparación al método a pajuela sellada, donde el menor daño se reflejará en mejores tasas de re-expansión *in vitro* a las 24 horas de cultivo *in vitro* post descongelación y las tasas de eclosión *in vitro* a las 24 y 72 horas post descongelación.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Evaluar la sobrevivencia *in vitro* post descongelación de blastocistos bovinos producidos *in vitro* y vitrificados por los métodos de vitrificación a pajuela sellada y pajuela abierta.

Objetivos específicos:

- Determinar la tasa de eclosión *in vitro* 72 horas post descongelación de blastocistos bovinos vitrificados por estas dos metodologías.
- Determinar la tasa de eclosión *in vitro* 24 horas post descongelación de blastocistos bovinos vitrificados por estas dos metodologías.
- Determinar la tasa de re-expansión *in vitro* 24 horas post descongelación de blastocistos bovinos vitrificados por estas dos metodologías.
- Determinar la tasa de degeneración *in vitro* 72 horas post descongelación.
- Determinar la tasa de criofractura de Zona Pelúcida post descongelación, para blastocistos vitrificados por estas dos metodologías.
- Determinar la tasa de recuperación post descongelación de blastocistos vitrificados por estas dos metodologías.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención y maduración *in vitro* de complejos cumulus ovocito (CCO):

Los ovarios fueron transportados desde el matadero en solución fisiológica estéril adicionada con antibióticos (Penicilina 80 UI/mL y estreptomicina 100 µg/mL) a 39°C. Los CCO se obtuvieron por aspiración (aguja 18 G) de folículos entre 2 a 8 mm de diámetro y el contenido se depositó en tubos cónicos de vidrio de 15 mL conteniendo fosfato buffer salino (PBS, Gibco¹) más 0,3% de albúmina sérica bovina (BSA fracción V, Sigma²). Los tubos fueron mantenidos durante 10 minutos en un baño María a 39°C para lograr que los CCO decantaran. Posteriormente con pipeta pasteur se aspiró el material decantado transfiriéndolo a una placa Petri en la cual se procedió a la búsqueda y selección de los CCO mediante una lupa estereoscópica con un aumento de 20x. Los criterios empleados para su selección fueron los establecidos por Leibfried y First (1979). Los CCO seleccionados se lavaron 3 veces en PBS más 0,3% BSA fracción V y luego dos veces en el medio de maduración. El medio de maduración empleado fue TCM – 199 suplementado al 10% de suero de ternero (Calf serum, Gibco¹); 50 µL/mL de gentamicina; 0,2 mM de piruvato de sodio; 0,8 µg/mL de hormona folículo estimulante (Folltopin[®]-V, Vetrepharm³) y 1 µg/mL de estradiol 17β (Sigma²). Los CCO se depositaron en grupos de 10 a 12 en gotas de 50 µL cubiertas con aceite mineral en placas Falcon 1007 (Becton-Dickinson⁴) e incubados durante 24 horas a 38,5°C, 5% CO₂ y humedad saturada.

¹ Gibco-BRL. Grand Island, NY, USA.

² Sigma. St. Louis, ST, USA.

³ Vetrepharm. London, Ontario, Canadá.

⁴ Becton Dickinson. NY, USA

Inseminación *in vitro*:

Para el procesamiento del semen se utilizó el medio Tyrode modificado (Sp-Talp; Fert-Talp). Se descongelaron 2 pajuelas de un mismo toro con fertilidad probada, proveniente del Centro de Inseminación Artificial, de la Universidad Austral de Chile, en un baño María con agua a 37° C durante 1 minuto. El semen fue centrifugado por 20 minutos a 700 g, a través de una gradiente discontinua de Percoll 45/90 (Sigma), con el fin de obtener espermatozoides con alta motilidad. Para preparar la gradiente previamente se preparó un stock de Percoll 90%, sobre el cual se depositó 1 ml de Percoll 45% (mezcla 1:1 de Percoll 90% y solución Sp-Talp 1x). Posterior a la centrifugación, con pipeta Pasteur se descartó el sobrenadante y el precipitado se volvió a lavar mediante centrifugación por 6 minutos a 500 g con Sp-Talp, finalmente, el precipitado resultante se resuspendió en medio Fert-Talp, suplementado con 20 ug/mL de heparina sódica, penicilamina 2 mM, hipotaurina 1 mM y epinefrina 250 uM (Leibfried y Bavister, 1982) hasta obtener una concentración aproximada de $1,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Con dicha suspensión, se hicieron gotas de 50 μ L en una placa Falcon 1007 cubiertas con aceite mineral. Paralelamente entre 10 - 12 CCO fueron lavados en el mismo medio de fecundación y se depositaron en las gotas de inseminación, incubándose los gametos durante 18 horas a 38,5° C, 5% CO₂ y humedad saturada.

Cultivo *in vitro*:

A las 18 horas post-inseminación los presuntos cigotos fueron depositados en un tubo eppendorf® de 1 mL conteniendo PBS y se agitaron mecánicamente durante 3 minutos en un vortex, con el fin de remover las células del cúmulo. Después de ser lavados en PBS + 0,3% BSA fracción V, los presuntos cigotos

fueron trasferidos en grupos de 40 a gotas de 50 μ L de medio de cultivo consistente en TCM – 199, suplementado con 10% de suero de ternero, piruvato 0,2 mM y gentamicina al 5 %, mantenidos a 38,5° C, 5% CO₂ y humedad saturada. A cada gota de cultivo se le introdujo 1 μ L de suspensión de células oviductales.

Preparación de Células Oviductales:

Los oviductos provenientes del matadero local, fueron transportados a temperatura de refrigeración hacia nuestro laboratorio, lugar donde se procedió a su dihibridación y extracción del fluido oviductal mediante una suave compresión en toda su longitud. Las células oviductales fueron lavadas tres veces por decantación con 10 mL de TCM – 199, suplementado con 3% de suero de ternero, piruvato de sodio 0,2 mM y sulfato de gentamicina 50 μ g/mL. Posterior al último lavado, el material decantado se resuspendió en 10 mL del mismo medio, pero suplementado con 10% de suero de ternero, piruvato de sodio 0,2 mM y sulfato de gentamicina 50 μ g/mL. La incubación se realizó en un frasco de cultivo Nunclon® (capacidad 50 mL) durante 48 horas a 38,5 °C, 5% CO₂ y humedad saturada. Luego de este período, las células oviductales fueron lavadas nuevamente por decantación y, finalmente, 1 μ L de esta suspensión se introdujo en gotas de 50 μ L del mismo medio. Los cigotos fueron trasferidos a dichas gotas e incubados durante 7 – 8 días a 38,5 °C, 5% CO₂ y humedad saturada. A las 48 horas de iniciado el cultivo *in vitro*, a la gota original se le adicionó 50 μ L frescos del mismo medio.

CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES:

Para tal propósito se utilizaron blastocistos bovinos expandidos producidos *in vitro* los días 7 y 8 de cultivo, de calidad morfológica excelente y buena, categorización establecida por Lindner y Wright (1983). Los blastocistos seleccionados fueron aleatoriamente asignados a los grupos de vitrificación que se detallan a continuación.

VITRIFICACIÓN TRADICIONAL (PAJUELA SELLADA).

Se empleó la técnica reportada por Saito e Imai (1997). En resumen, los embriones fueron lavados en parejas en PBS a 38,5° C y luego fueron depositados en las soluciones crioprotectoras, en una secuencia de tres etapas:

Etapas N°1:

Por un lapso de 5 minutos, el embrión fue expuesto a la solución de vitrificación número 1 (VS1), consistente en Sacarosa 0,1 M, Xilosa 0,1 M, Polietilenglicol 1%, Glicerol 10%, disueltos en Dulbecco PBS (D – PBS).

Etapas N°2:

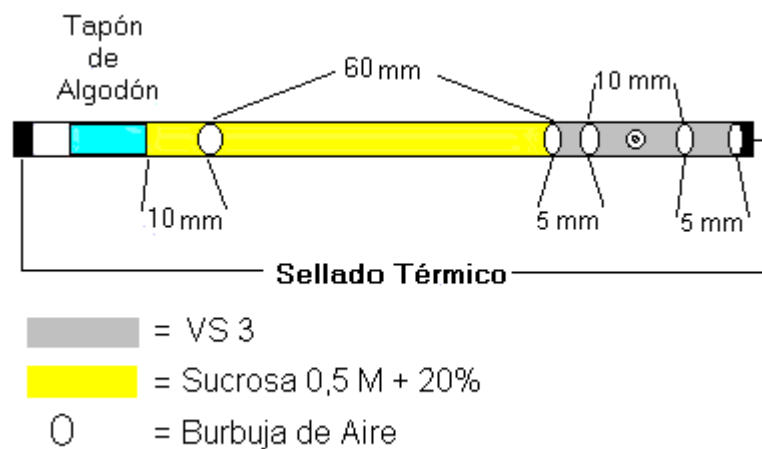
Por otros 5 minutos, permaneció el embrión en la solución de vitrificación número 2 (VS2), consistente en Sacarosa 0,2 M, Xilosa 0,2 M, Polietilenglicol 2%, Glicerol 10%, Etilenglicol 10%, disueltos en D – PBS.

Etapa N°3:

En este paso, el embrión tomó contacto con la solución de vitrificación número 3 (VS3), consistente en Sacarosa 0,3 M, Xilosa 0,3 M, Polietilenglicol 3%, Glicerol 20%, Etilenglicol 20%, disueltos en D – PBS, por un lapso de tiempo no superior a 1 minuto, considerando las maniobras de cargado de la pajuela y su sellado térmico. Finalizado el minuto de exposición a la VS3, se introdujo la pajuela directamente al N₂L, lentamente en un ángulo de 45° por el extremo del tapón de algodón.

Tanto las soluciones VS1, VS2, VS3 como la solución de Sucrosa (20% Suero de Ternero) fueron utilizadas a temperatura ambiente (23 a 27° C). La composición de cada una de estas soluciones se describen en el anexo N°1.

Para este proceso se utilizaron pajuelas francesas de 0,25 mL, que fueron cargadas según el esquema siguiente:



Descongelación:

Se retiró la pajuela del nitrógeno líquido y se sostuvo al aire por 5 a 6 segundos para luego introducirla por otros 20 segundos en un recipiente con agua a 20° C. Posteriormente se depositó su contenido sobre una placa petri vacía, en donde se procedió a la búsqueda de los embriones.

Recuperados los embriones, fueron depositados en las soluciones de descongelación (Sucrosa 0,5 M y 0,25 M, ambas al 20% suero de ternero y mantenidas a temperatura ambiente) por un periodo de 5 minutos en cada una de ellas.

VITRIFICACIÓN CON OPEN PULLED STRAW (PAJUELA ABIERTA).

Se utilizó el protocolo descrito por Vajta y col. (1997). En resumen 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 de vitrificación.

Una vez extraídos desde las gotas de cultivo, los embriones fueron lavados en parejas en PBS a 39° C y luego fueron depositados en TCM – 199 (sin bicarbonato de sodio) adicionado con 20% de suero de ternero a 39° C, hasta comenzar con el proceso de equilibrio en las soluciones crioprotectoras.

Los embriones fueron depositados en la solución de vitrificación 1 consistente en Etilenglicol 10% y DMSO 10%, por un período de 1 minuto.

Posteriormente fueron traspasados a la solución de vitrificación 2 consistente en Etilenglicol 20% y DMSO 20% por 20 segundos. Dentro de este tiempo, se formó con la solución de vitrificación 2 una gota de 20 μ L en la cual fueron depositados los embriones. Finalmente, los embriones fueron tomados en 3 μ L desde la gota de solución de vitrificación 2 para formar una gota de ese mismo volumen y de la cual los embriones fueron levantados por capilaridad con el extremo delgado de la pajuela. Una vez cargada la pajuela se introdujo al N₂L estando los embriones en contacto con la solución de vitrificación 2 por no más de 20 segundos. Las soluciones de vitrificación 1 y 2 fueron mantenidas a 39° C y su composición es descrita en el anexo N° 2.

Descongelación:

Se retiró la pajuela desde el N₂L para introducir inmediatamente su extremo delgado dentro de la solución de descongelación 1 consistente en 1200 μ L de PBS, 5% CS, 0,3 M Trehalosa, donde el embrión permaneció por un período de 1 minuto. Luego fue transportado a la segunda solución de descongelación consistente en 800 μ L de PBS, 5% CS, 0,3 M Trehalosa por otros 5 minutos. Luego fueron lavados en TCM – 199 (sin bicarbonato de sodio) adicionado con 20% de suero de ternero a 39° C, desde donde luego fueron llevados a cultivo *in vitro*. Las soluciones de descongelación permanecieron a 39° C y su composición es descrita en el anexo N° 2.

CULTIVO POST DESCONGELACIÓN.

Finalizado el proceso de descongelación, se procedió al cultivo *in vitro* de los blastocistos en forma independiente para cada grupo de vitrificación. Los blastocistos fueron transferidos a gotas de 50 μ L de medio de cultivo TCM – 199 adicionado con 10% de suero de ternero, 0,2 mM piruvato, gentamicina y 0,1 mM β -Mercaptoetanol. Las condiciones de cultivo fueron de 38,5° C, 5% CO₂ y humedad saturada.

Los embriones fueron cultivados por un período de 72 horas, donde una vez al día se evaluó los distintos estadios de desarrollo embrionario.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los parámetros evaluados para ambos métodos de criopreservación fueron las tasas de re-expansión *in vitro* a las 24 horas de cultivo post descongelación, las tasas de eclosión *in vitro* a las 24 horas de cultivo post descongelación, las tasas de eclosión *in vitro* a las 72 horas de cultivo post descongelación y las tasas de degeneración a las 72 horas de cultivo post descongelación. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test de Chi-Cuadrado y se aplicó el índice de corrección de Yates. El nivel de significancia fue establecido en $p < 0,05$.

Las tasas de criofractura de Zona Pelúcida post descongelación de los blastocistos vitrificados y las tasas de recuperación embrionaria post descongelación se describieron y compararon mediante estadística básica (descriptiva).

RESULTADOS

Se vitrificaron 122 blastocistos, de los cuales 63 fueron vitrificados con el método a pajuela sellada y 59 fueron vitrificados mediante pajuela abierta. Un total de 108 blastocistos fueron recuperados post descongelación, de los cuales 54 provenían de la pajuela sellada y los 54 restantes provenían de la vitrificación por pajuela abierta, lo que nos arrojó un porcentaje de recuperación post descongelación del 85,7% (54/63) y 91,5% (54/59) para los procesos de vitrificación a pajuela sellada y pajuela abierta, respectivamente.

La tasa de criofractura de zona pelúcida para blastocistos vitrificados a pajuela abierta fue del 14,8% (8/54), mientras que ninguno de los embriones vitrificados por el método a pajuela sellada presentó mencionada lesión.

La tasa de re-expansión *in vitro* a las 24 horas de cultivo post descongelación para los blastocistos vitrificados por el método a pajuela sellada y pajuela abierta, mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) (Cuadro 1).

Cuadro 1: Re-expansión *in vitro* 24 horas post descongelación de blastocistos bovinos producidos *in vitro*, criopreservados con los métodos de vitrificación a pajuela sellada y pajuela abierta.

Proceso de Vitrificación	Blastocistos Cultivados	Categoría embrionaria (%)	
		<i>Re - expandidos</i>	<i>No re - expandidos</i>
Pajuela Sellada	54	27 (50) ^a	27 (50) ^a
Pajuela Abierta	54	39 (72,2) ^b	15 (27,8) ^b

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

Cabe destacar que al momento de la evaluación de sobrevivencia en base a la tasa de re-expansión *in vitro* a las 24 horas de cultivo el, 1,8% (1/54) de los blastocistos vitrificados mediante pajuela sellada se encontraban eclosionados de igual forma que el 12% de los blastocistos vitrificados a pajuela abierta, observándose diferencias significativas ($p < 0,01$) (Cuadro 2).

Cuadro 2: Eclosión *in vitro* 24 horas post descongelación de blastocistos bovinos producidos *in vitro*, criopreservados con los métodos de vitrificación a pajuela sellada y pajuela abierta.

Proceso de Vitrificación	Blastocistos Cultivados	Categoría embrionaria (%)	
		<i>Eclosionados</i>	<i>No Eclosionados</i>
Pajuela Sellada	54	1 (1,8) ^a	53 (98,2) ^a
Pajuela Abierta	54	12 (22,2) ^b	42 (77,8) ^b

a, b: Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,01$).

Por su parte, la tasa de eclosión *in vitro* a las 72 horas de cultivo post descongelación para los blastocistos vitrificados por el método a pajuela sellada y pajuela abierta, arrojó diferencias significativas ($p < 0,01$) (Cuadro 3).

Cuadro 3: Tasa de eclosión *in vitro* 72 horas post descongelación de blastocistos bovinos producidos *in vitro*, criopreservados con los métodos de vitrificación a pajuela sellada y pajuela abierta.

Proceso de Vitrificación	Blastocistos Cultivados	Categoría embrionaria (%)	
		<i>Eclosionados</i>	<i>No Eclosionados</i>
Pajuela Sellada	54	10 (18,5) ^a	44 (81,4) ^a
Pajuela Abierta	54	34 (63) ^b	20 (37) ^b

a, b: Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,01$).

La tasa de embriones degenerados a las 72 horas para los blastocistos vitrificados mediante pajueta sellada y pajueta abierta, demostró diferencias significativas ($p < 0,01$) (Cuadro 4).

Cuadro 4: Tasa de degeneración *in vitro* 72 horas post descongelación de blastocistos bovinos producidos *in vitro*, criopreservados con los métodos de vitrificación a pajueta sellada y pajueta abierta.

Proceso de Vitrificación	Blastocistos Cultivados	Blastocistos Degenerados	Porcentaje de Degeneración (%)
Pajueta Sellada	54	37	68,5 ^a
Pajueta Abierta	54	18	33,3 ^b

a, b: Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,01$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio apoyan lo señalado por diversos autores, quienes indican que es factible el uso de distintas metodologías de vitrificación como método de criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro* (Kuwayama y col. 1992; Tachikawa y col. 1993; Saito y col. 1994; Vajta y col. 1998a; Vajta y col. 1998b; Vajta y col. 1999; Lazar y col. 2000; Arteaga y col. 2002; Arteaga 2003; Soto 2003).

En cuanto a los resultados obtenidos con el protocolo de vitrificación a pajuela sellada, estos difieren con los obtenidos por el grupo de investigadores que desarrollaron la técnica (Saito e Imai, 1997), quienes reportan tasas del 88,9% y 84,4% para la re-expansión a las 48 horas y eclosión a las 96 horas, respectivamente.

Saito e Imai (1997) determinaron que la modificación realizada sobre el protocolo original de Saito y col. (1994), consistente en la adición de azúcares a la solución de vitrificación, especialmente Sacarosa y Xilosa, mejora significativamente la tasa de sobrevivencia de los blastocistos bovinos vitrificados. Dicha mejoría se explica debido a que la adición de azúcares reduce la rápida penetración de los crioprotectores en el embrión y facilita la vitrificación intracelular por el incremento de la concentración de proteína citoplasmática (Rall, 1987). Aunque este último protocolo fue el utilizado en nuestro trabajo, los resultados obtenidos, como ya fue mencionado, fueron menores a los reportados por los citados autores, lo que podría

explicarse por la reciente inclusión de esta técnica de vitrificación al trabajo de criopreservación de nuestro laboratorio.

Esto último concuerda con Arteaga y col. (2002) y Arteaga (2003), quienes utilizando el mismo protocolo, obtuvieron un 50 y 56,9% de re-expansión/eclosión *in vitro* a las 24 horas post descongelación. Al igual que en nuestro trabajo, estos autores se encontraban implementando la técnica (Arteaga 2002, comunicación personal).

Con respecto a la vitrificación a pajueta abierta, Vajta y col. (1998a), quienes desarrollaron la técnica, reportan tasas de eclosión *in vitro* del 94% a las 72 horas, la cual es mayor a las obtenidas en el presente trabajo (63% a las 72 horas post descongelación).

Sin embargo, nuestros resultados son comparables a los obtenidos por otros autores que han utilizado esta técnica de vitrificación a pajueta abierta (Lazar y col., 2000), quienes obtuvieron una tasa de re-expansión *in vitro* post descongelación del 74,6% a las 24 horas de cultivo, observándose una gran similitud con respecto a nuestros resultados obtenidos en dicha categoría.

De la misma manera, al comparar los resultados de la técnica a pajueta abierta, con trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio (Soto, 2003), se observa una mejoría en términos de la tasa de re-expansión *in vitro* 24 horas post descongelación (72,2% v/s 59,2%). En términos de la tasa de eclosión *in vitro* a las 24 horas post descongelación, nuestros resultados (22%) son mayores a los del

citado autor (7,4%). Así mismo, en relación a la eclosión *in vitro* obtenida a las 72 horas post descongelación, se obtuvieron tasas mayores (63% v/s 24%).

Estas diferencias con respecto al trabajo de Soto (2003) pueden deberse, en parte, a la modificación realizada en el protocolo de descongelación consistente en el reemplazo de la Sucrosa, por Trehalosa, como elemento hiperosmótico, para la remoción de los crioprotectores durante la descongelación de los blastocistos (Vajta y col., 2001), asegurando así una mayor remoción de los crioprotectores presentes al interior de la membrana plasmática de los embriones en descongelación y con ello una disminución en el daño celular causado por la toxicidad de los crioprotectores empleados.

En cuanto a la comparación de ambas técnicas y de acuerdo a los resultados obtenidos, es evidente la superioridad de la técnica de vitrificación mediante pajuela abierta sobre la vitrificación a pajuela sellada. Esta superioridad puede deberse a múltiples ventajas en el proceso de vitrificación y descongelación a favor de la vitrificación a pajuela abierta, como por ejemplo, la tasa de enfriamiento resulta ser 10 veces más alta que la registrada durante la vitrificación a pajuela sellada (20.000° C/min. para pajuela abierta y 2.000° C/min. para pajuela sellada) (Vajta y col., 1998a), esto debido a que la pajuela utilizada en el proceso a pajuela abierta sufre una modificación en su estructura consistente en una disminución del grosor de su pared mediante el estiramiento de la pajuela convencional, produciendo con ello una disminución de la barrera disipadora del frío aportado por el contacto con el N₂L, en cambio la pajuela empleada para la vitrificación a pajuela sellada permanece intacta

y su pared es comparativamente más gruesa, disminuyendo la tasa de enfriamiento para el proceso.

Por otra parte, el volumen de solución a congelar en el método a pajueta abierta es de aproximadamente 3 μL y para el proceso a pajueta sellada es de 0,25 mL, esta característica contribuye en forma importante a aumentar la tasa de enfriamiento, siendo en la práctica notoria la diferencia en la velocidad de solidificación del medio al interior de la pajueta empleada. En el proceso de vitrificación a pajueta sellada, la columna de hielo avanza lentamente desde el extremo que toma contacto con el N_2L , en cambio en el proceso de vitrificación a pajueta abierta, la solidificación de toda la columna del medio crioprotector es inmediata.

Además, el contacto directo que se produce entre la solución crioprotectora y el N_2L , en el caso de pajueta abierta, favorece el aumento de la tasa de enfriamiento, en cambio la pajueta empleada en la vitrificación a pajueta sellada previa a ser sumergida al N_2L , como su nombre lo indica, debe ser sellada bilateralmente, anulando el contacto directo entre la solución crioprotectora y el N_2L , lo que disminuye la tasa de enfriamiento para este proceso.

Esta última característica presentada por el método de vitrificación a pajueta abierta resulta ser un inconveniente al momento de utilizar la técnica con fines comerciales, debido al potencial riesgo de contaminación del embrión al tomar contacto directo con el N_2L , medio que no es estéril (Tedder y col. 1995). Sin embargo, han sido diseñadas estrategias para minimizar estas limitaciones por

diversos autores, algunos han desarrollado una aplicación estéril del método OPS, en la cual el nitrógeno líquido utilizado en el proceso de congelación es filtrado (0,2 μm) previo a su uso (Vajta y col., 1998b). Otros han optado por la alternativa denominada Closed Pulled Straw (Pajuela Estirada y Sellada, CPS) en la cual se sella el extremo delgado de la OPS usando Polivinil alcohol, para evitar el contacto entre el N_2L y el medio que contiene el embrión (Chen y col., 2001; López-Bejar y López-Gatius, 2002).

Otro factor que puede haber influido en disminuir las tasas de re-expansión y eclosión obtenidas, es la selección de los embriones para su vitrificación. Como ya se mencionó, se seleccionaron blastocistos expandidos de excelente y buena calidad, producidos en los días 7 y 8 de cultivo *in vitro*. Sin embargo, el hacer más estrictos los criterios de selección, sólo vitrificando blastocistos de día 7 de cultivo, probablemente aumentaría las tasas de viabilidad post descongelación, como lo demuestran diversos investigadores (Greeve y col., 1992; Mermillod y col., 1992; Del Campo y col., 1993).

La facilidad en el cargado de los embriones al interior de la pajuela para la vitrificación a pajuela abierta es otra ventaja que ofrece la técnica sobre la Vitrificación Tradicional, puesto que sólo requiere del contacto directo del extremo delgado de la pajuela donde por efecto de la capilaridad el o los embriones ascienden al interior de la pajuela (Vajta y col., 1998a), en cambio la vitrificación a pajuela sellada requiere del uso de dispositivos de ayuda para el cargado lo que a su vez requiere la pericia del operador. Además, el tiempo requerido para desarrollar el proceso de vitrificación a pajuela abierta es marcadamente inferior que

el empleado para la vitrificación a pajuela sellada, requiriendo de un minuto con veinte segundos, en cambio la vitrificación a pajuela sellada precisa de 11 minutos.

Se podría considerar, por tanto, que el factor determinante en la obtención de mejores tasas de re expansión y eclosión in vitro con la metodología a pajuela abierta corresponde a la alta tasa de congelación lograda con esta técnica. Esto concuerda con lo señalado por algunos autores (Arav y col., 2000), quienes indican que los factores determinantes del éxito en el proceso de la vitrificación de embriones bovinos, son: el volumen de la muestra, la concentración del crioprotector (viscosidad de la solución) y la tasa de enfriamiento. Señalan también, que la probabilidad de la formación de cristales de hielo intracelular es directamente proporcional al volumen de la muestra a vitrificar e inversamente proporcional a la viscosidad y a la tasa de enfriamiento. Por otros parte, varios autores (Dobrinsky, 1996; Martino y col., 1996a, b; Isachenko y col., 1998; Zeron y col., 1999) señalan que mientras mayor sea la tasa de enfriamiento, más rápido se traspasará la barrera térmica de los 15 a -5 °C, rango de temperatura en el cual se produce el máximo daño celular durante el proceso de vitrificación, debido a lesiones de las gotas lipídicas intracelulares, daño de las membranas celulares y del citoesqueleto.

Cabe señalar finalmente, que de acuerdo a la literatura, la técnica de OPS al contar con una mayor tasa de enfriamiento ofrece una disminución en el porcentaje de crioinjuria de la zona pelúcida de los embriones vitrificados (Vajta y col., 1998a), no obstante, nuestros resultados arrojan valores contradictorios con respecto a esta característica, presentándose un 14,8% de embriones crio fracturados post

descongelación, mientras que para la técnica a pajueta sellada no se presentó ningún caso.

CONCLUSIÓN

- El método de vitrificación a pajueta abierta es superior al método de vitrificación a pajueta sellada, ya que las tasas de re-expansión *in vitro* a las 24 horas de cultivo, eclosión *in vitro* a las 24 y 72 horas de cultivo y degeneración determinada a las 72 horas de cultivo post descongelación, fueron estadísticamente significativas a favor de la técnica a pajueta abierta.

BIBLIOGRAFIA

- ARAV, A., Y. ZERON y A. OCHERENTY. 2000. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* 53: 248. Abst.
- ARTEAGA, X., C. SCHÜLER y R. GATICA. 2002. Primeros resultados de sobrevivencia de embriones bovinos vitrificados a los 7 y 10 días de cultivo *in vitro*. XXVII Reunión de la Sociedad Chilena de Producción Animal. Libro de resúmenes. Chillán, Chile. pp.203 – 204.
- ARTEAGA, X. 2003. Vitrificación de embriones bovinos a los 7 y 10 días post inseminación artificial, obtenidos *in vivo* e *in vitro*. Tesis, M.Sc. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Reproducción Animal. Valdivia, Chile.
- CABODEVILLA, J. y M. TERUEL. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. Citado por: PALMA G. 2001. Biotecnología de la Reproducción. Ed. INTA Balcarce. Argentina.
- CHEN, S. U.; LIEN, Y. R.; CHENG, Y. Y.; CHENG, H. F.; HO, H. N. y Y. S., YANG 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum. Reprod.* 16(11):2350-2356.
- DOBRINSKY, J.R., F.F. HESS, R.T. DUBY y J.M. ROBL. 1991. Cryopreservation of bovine embryos by vitrification. *Theriogenology* 35: 194.
- GORDON, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB. International. Irlanda. pp: 639.
- ISACHENKO, V., C. SOLER, E. ISACHENKO, F. PEREZ-SANCHEZ y V. GRISHCHENKO. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36: 250 – 253.
- KANAGAWA, H., I. SHIMOHIRA y N. SAITOH. 1995. Manual of bovine embryo transfer. Japan Livestock Technology Association.
- KASAI, M., J.H. KOMI, A. TAKAKAMO, H. TSUDERA, T. SAKURAI y T. MACHIDA. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification, without appreciable loss of viability. *Journal of Reproduction and Fertility* 89: 91-97.
- KASAI, M., Y. HAMAGUCHI, S.E. ZHU, T. SAKURAI y T. MACHIDA. 1991. High survival of rabbit morulae after vitrification in a ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biology of Reproduction* 44: (supl.1), 158 (Abs.421).

- KUWAYAMA, M., S. HAMANO y T. NAGAI. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 96: 187 – 193.
- LAZAR, L., J. SPAK y V. DAVID. 2000. The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocyst 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.
- LEIBFRIED, L. y N.L. FIRST. 1979. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *Journal of Animal Science*. 48: 76-86.
- LEIBFRIED, L. B. D. BAVISTER. 1982. Effect of epinephrine and hipotaurine on *in vitro* fertilization in the golden hamster. *J. Reprod. Fert.* 66: 87 – 93.
- LEIBO, S.P. 1988. Criopreservación de embriones. Proceedings on the Eleventh International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Dublin. 5: 370 – 377.
- LINDNER, G.M. y R.W. WRIGHT. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407 – 416.
- LÓPEZ-BEJAR, M. y LÓPEZ-GATIUS F. 2002. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology* 58(8):1541-1552.
- MARTINO, A., J. POLLARD y S. LEIBO. 1996a. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 45: 503 – 512.
- MARTINO, A. N. SONGSASEN y S. LEIBO. 1996b. Development into blastocyst of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54: 1059 – 1069.
- MAZUR, P. 1977. Slow-freezing injury in mammalian cells. En: *The freezing of mammalian embryos*. Ciba Found. Symp. 52 (new series). Elsevier, Excerpta Medica. North-Holland. Amsterdam. pp. 19-48.
- PALASZ, A. T. y R. J. MAPLETOFT. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.* 14: 127 – 149.
- POLGE, C. y L.E.A. ROWSON. 1952. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -7° C. *Nature (London)* 169: 626 – 627.
- RALL, W.F. y G.M. FAHY. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature (London)* 313: 573-575.

- RALL, W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24: 387 – 402.
- RALL, W.F. y T.K. MEYER. 1989. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology* 31: 683- 692.
- RATTO, M., M. BERLAND, M. WOLTER, M. SILVA y R. MATAMOROS. 1998. Vitrificación de embriones bovinos: Antecedente Preliminar. *Archivos de Medicina Veterinaria, Valdivia, Chile*. Vol XXX, Número extraordinario:187 – 188.
- SAITO, N. K. IMAI y M. TOMIZAWA. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology* 41: 1053 – 1060.
- SAITO, N. y K. IMAI. 1997. The effect of addition of various monosaccharides to vitrification solutions on the survival of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Cryobiology and Cryotechnology* 43: 34 – 39.
- SCHNEIDER, U. y P. MAZUR. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 21: 70-79.
- SCHNEIDER, U. y P. MAZUR. 1986. Implications and application of long-term preservation of embryos for freezing. In: MORROW, D. Ed. *Current Therapy in Theriogenology II*, Philadelphia, WB Saunders Co. pp 81-83.
- SOTO, D. 2003. Vitrificación de blastocistos bovinos producidos bajo dos sistemas de cultivo *in vitro*. Tesis de grado. Universidad Católica de Temuco. Escuela de Medicina Veterinaria. Temuco, Chile.
- TACHIKAWA, S., T. OTOI, S. KONDO, T. MACHIDA, y M. KASAI. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Repr. And Develop.* 34: 266 – 271.
- TEDDER, R.S., M.A. ZUCKERMAN, A.H. GOLDSTONE, A.E. HAWKINS, A. FIELDING, E.M. BRIGGS, D. IRWIN, S. BLAIR, A.M. GORMAN, K.G. PATTERSON, D.C. LINCH, J. HEPTONSTALL y N.S. BRINK. 1995. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 346: 137 – 140.
- VAJTA, G., P.J. BOOTH, P. HOLM, T. GREVE y H. CALLESEN. 1997. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-letters* 18: 191 – 195.
- VAJTA, G., P. HOLM, M. KUWAYAMA, P.J. BOOTH, H. JACOBSEN, T. GREVE y H. CALLESEN. 1998a. 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., I LEWIS, M. KAWAYAMA, T. GREVE y H. CALLENSSEN. 1998b. Sterile application of the Open Pulled Straw (OPS) vitrification method. *Cryo-Letters* 19: 389 – 392.
- VAJTA, G. 2001. Vitrification with OPS method. Taller: Nuevas propuestas en fecundación *in vitro*, criopreservación y clonaje de embriones. Universidad de la Frontera. Centro de Biotecnología en reproducción (CEBIOR). Temuco, Chile.
- WILLADSEN, S.M. 1977 Factors affecting the survival of sheep and cattle embryos during deep freezing and thawing. In: *The Freezing of Mammalian Embryos*. Ciba Foundation Symposium 52, Excerpta Medica, Amsterdam, 175 – 194.
- YANG, N.S., K.H. LU, I. GORDON y C. POLGE. 1992. Vitrification of bovine blastocyst produced *in vitro*. *Theriogenology* 37: 326.
- ZERON, Y., M. PEARL, A. BOROCHOV y A. ARAV. 1999. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology* 38: 35 – 42.

Anexo N°1**MEDIOS DE VITRIFICACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE EMBRIONES.****VS1**

- Sacarosa 1,7115 g (0,1 M)
- Xilosa 0,7507 g (0,1 M)
- PEG 0,5 g (1%)
- G 5 ml (10%)
- D – PBS hasta 50 ml

VS2

- Sacarosa 3,4230 g (0,2 M)
- Xilosa 1,5013 g (0,2 M)
- PEG 1 g (2%)
- G 5 ml (10%)
- EG 5 ml (10%)
- D – PBS hasta 50 ml

VS3

- Sacarosa 5,1345 g (0,3 M)
- Xilosa 2,2520 g (0,3 M)
- PEG 1,5 g (3%)
- G 10 ml (20 %)
- EG 10 ml (20%)
- D – PBS hasta 50 ml

Solución Stock de Sucrosa

- Sacarosa 10,697 g
- D – PBS hasta 50 ml

Solución de Sucrosa 0,5 M

- Solución stock de Sacarosa 4 ml
- Suero Fetal Bovino 1 ml

Solución de Sucrosa 0,25 M

- Solución stock de Sacarosa 2 ml
- Dulbecco PBS 2 ml
- Suero Fetal Bovino 1 ml

Anexo N° 2

MEDIOS DE VITRIFICACIÓN (OPEN PULLED STRAW) (Vajta, 2001)

Preparación de las soluciones de vitrificación:

Los embriones serán retirados de las gotas de cultivo y mantenidos en medio TCM - 199 de mantención (TCM-H, Holding Medium, HM), el que consiste en TCM tamponado con sal de Hepes sin bicarbonato de calcio (pH 7,4), al cual se le adicionará 20% de suero fetal bovino.

Solución de vitrificado 1:

800 μ l de HM + 100 μ l Etilenglicol + 100 μ l DMSO

Solución de vitrificado 2:

600 μ l de HM + 200 μ l Etilenglicol + 200 μ l DMSO

Vitrificación:

Utilizar placas multi-well (4 pocillos)

Posillo 1: 800 μ l de HM

Posillo 2: 800 μ l de HM

Posillo 3: solución de vitrificación 1

Posillo 4: solución de vitrificación 2

Los cuatro pocillos deberán permanecer recubiertos con aceite mineral para evitar la deshidratación de los medios.

Descongelación:

Utilizar placas multi-well (4 pocillos)

Posillo 1: 1200 μ l (PBS + 5%CS) + 0.3 M Trehalosa

Posillo 2: 800 μ l (PBS + 5%CS) + 0.3 M Trehalosa

Posillo 3: 800 μ l (PBS + 5%CS)

Posillo 4: 800 μ l (PBS + 5%CS)

De igual forma los cuatro pocillos deberán permanecer recubiertos con aceite mineral para evitar la deshidratación de los medios.