

Vitrificación de embriones bovinos obtenidos *in vitro*

Alejandro Gustavo Martínez,¹ Alberto Valcárcel²

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigaciones Reproductivas Pérez Companctiva.

1) Unidad de Fertilidad San Isidro (Unifer); 2) Instituto de Ginecología y Fertilidad (IFER)

Reproducción 2008;23:21-33

Resumen

Se evaluó la eficiencia de diferentes soluciones de vitrificación para criopreservar blastocistos bovinos producidos *in vitro*. Para ellos se realizaron evaluaciones mediante cultivo *in vitro*. Se compararon 2 soluciones de vitrificación: Propilenglicol + Glicerol (Pg+Gli) y Etilenglicol + Ficoll + Sacarosa (EFS). Se encontraron diferencias significativas en las tasas de desarrollo y eclosión en favor de EFS (56.4 vs 33.3% y 35.4 vs 13.3 %; $P < 0.05$). Luego se compararon 3 soluciones de vitrificación: EFS, EFS modificado (EFSm) y Etilenglicol + Glicerol (Eg+Gli). Las soluciones EFSm y Eg+Gli alcanzaron mayores tasas de eclosión que la solución EFS (57.7 vs 59.6 vs 35.7%; $P < 0.05$). Finalmente, la solución Eg+Gli fue evaluada en combinación con diferentes concentraciones de sacarosa. No se encontraron diferencias significativas en la tasa de desarrollo de las diferentes soluciones, mientras que las tasas de eclosión de la solución Eg+Gli combinada con sacarosa 0.1 M o 0.3 M fueron mayores que la misma solución sin sacarosa o combinada con 0.5 M. Finalmente se realizaron evaluaciones mediante transferencia a receptoras empleando como control embriones bovinos producidos *in vivo*. Las tasas de preñez y nacimientos de los embriones producidos *in vivo* fueron significativamente mayores que las de los embriones producidos *in vitro*. No

hubo diferencias en la duración de la gestación y la proporción de sexos, mientras que el peso al nacer de los terneros provenientes de embriones producidos *in vitro* fue significativamente mayor que los originados a partir de embriones producidos *in vivo*. Se registró una cantidad significativamente mayor de partos distócicos en los tratamientos que emplearon embriones producidos *in vitro*. Estos resultados muestran que la vitrificación puede ser usada con éxito en la criopreservación de embriones producidos *in vitro*, y que podría ser considerada para su uso en programas comerciales.

Palabras clave: Etilenglicol, glicerol, sacarosa, preñez, criopreservación.

Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos

Summary

The efficacy of different vitrification solutions to cryopreserve *in vitro*-produced bovine blastocysts was evaluated based on *in vitro* development of embryos in culture. In the first experiment, 2 vitrification solutions were compared: propylene glycol + glycerol (Pg+Gly) and ethylene glycol + Ficoll + sucrose (EFS). Differences in the overall development and hatching rates in favor of EFS were found (56.4 vs 33.3% and 35.4 vs 13.3 %; $P < 0.05$). In the second experiment, 3 vitrification solutions were compared: EFS, modified EFS (EFSm) and ethylene glycol + glycerol (Eg+Gly). The vitrification solutions EFSm and Eg+Gly yield higher hatching rates than did EFS (57.7 vs

Correspondencia: Alejandro Gustavo Martínez
Antártida Argentina 1640 (1609) Boulogne - Buenos Aires
Tel.: 4719-6729
E-mail: agmartinez@fibertel.com.ar

59.6 vs 35.7%; $P < 0.05$). Finally *Eg+Gly plus different sucrose concentrations were evaluated. There were no significant differences in development rates among solutions. As for hatching, the *Eg+Gly plus 0.1 M sucrose group had a greater rate as compared with *Eg+Gly plus 0 M sucrose and *Eg+Gly plus 0.5 M sucrose groups and, *Eg+Gly plus 0.3 M sucrose group had a greater rate as compared with the *Eg+Gly plus 0 M sucrose and *Eg+Gly plus 0.5 M sucrose groups. Finally, in vivo development of embryos was evaluated by transferred into recipients, using in vivo produced bovine embryos as control. Pregnancy and calving rates showed a difference between in vivo produced embryos freshly transferred and in vitro produced embryos. There were no significant differences in gestation length and sex ratio between treatments. As for birth weight, there were significant differences between fresh in vivo produced embryos and all treatments of in vitro produced embryos. There were significant differences in dystocia parturition between in vivo produced embryos and all treatments with in vitro-produced embryos. These results demonstrate that vitrification can be used successfully in the cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos, and that it might be considered for use in commercial programs.*******

Key words: Ethylene glycol, glycerol, sucrose, pregnancy, cryopreservation.

Introducción

Desde que en 1973 fue reportado el nacimiento del primer ternero a partir de un embrión congelado (Wilmut y Rowson, 1973), se han realizado progresos considerables que han conducido a mejorar los métodos de criopreservación para embriones obtenidos *in vivo* (Fahning y García, 1992; Niemann, 1991). En años recientes los mayores esfuerzos han sido dirigidos a mejorar la tasa de sobrevida de los embriones obtenidos *in vitro* luego de la criopreservación

(Hasler y col., 1995; Kaidi y col., 2000; Leibo y Loskutoff, 1993; Mahmoudzadeh y col., 1994; Massip y col., 1993; Palasz y col., 1997; Sommerfeld y Niemman, 1999; Suzuki y col., 1993; Vajta y col., 1996; Würth y col., 1994). Para ello se han empleado dos enfoques: modificar los sistemas de cultivo *in vitro* y desarrollar técnicas de criopreservación especialmente adaptados a este tipo de embriones (Greve y col., 1993; Massip y col., 1995; Vajta, 1997).

El objetivo del presente trabajo ha sido comparar diferentes protocolos de vitrificación y realizar modificaciones para adaptarlos a los embriones bovinos obtenidos *in vitro*. Para ello se realizaron evaluaciones de sobrevida *in vitro* de los embriones luego de ser vitrificados y, finalmente, se evaluó la sobrevida embrionaria mediante transferencias.

Materiales y métodos

Donantes de ovocitos

Las drogas, hormonas, reactivos y otros productos empleados en los diferentes experimentos fueron obtenidos de los siguientes proveedores:

- 17 beta estradiol: Laboratorio Río de Janeiro, Santa Fe, Argentina.
- Aceite mineral: Laboratorios Pharmos, Buenos Aires, Argentina.
- Antibiótico antimicótico (AA) y solución *buffer* fosfato salina de Dulbecco (DPBS): Gibco, Grand Island, NY, EUA.
- Dispositivo intravaginal de progesterona (*Easy Breed* - CIDR): InterAg, Hamilton, New Zealand.
- FSH (Folltropin-V): Vetrepharm Inc, London, ON, Canada.
- FSH porcina (pFSH) y Cloprostenol – Estrumate: Schering Laboratories, Omaha, NE, EUA.
- GnRH (Receptal) Laboratoire Hoechst, Munich, Alemania.
- LH ovina purificada Immuno Chemical Products, Auckland, New Zealand.

El resto de los productos utilizados para la preparación de medios y soluciones fue obtenido de Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA.

En todos los casos se utilizó agua ultrapurificada mediante un filtro NanoPure (SKC Inc., Eighty Four, PA, USA).

Producción de embriones bovinos obtenidos *in vitro*

Aspiración folicular de las donantes: como donantes de ovocitos se emplearon vacas Hereford adultas (edad: 4 a 8 años; peso corporal promedio \pm DS: 574 ± 40 kg). La punción de los folículos se realizó empleando una aguja de 18 G x 45 cm conectada a una bomba de vacío. La aspiración fue guiada mediante un ecógrafo Aloka 500 (Aloka, Tokyo, Japan) con un transductor lineal de 7,5 MHz (Bols y col., 1995a).

Como medio para la aspiración de los oocitos se empleó TCM 199 combinado con 0,05 mg/ml de heparina, 100 UI/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomina, 0,05 mg/ml de kanamicina, y 0,5% de BSA-FAF.

Maduración *in vitro*: una vez extraídos del líquido de aspiración bajo lupa, los ovocitos fueron transferidos al medio de mantenimiento compuesto por TCM 199 combinado con HEPES 15 mM (empleado como *buffer*) y 10% de SFB. Para la maduración *in vitro* (IVM) los ovocitos fueron lavados dos veces en medio de mantenimiento y dos veces en un medio compuesto por TCM 199-bicarbonato combinado con 10% de SFB, 10 μ g/ml de LH ovina purificada (NIH-oLH-S1), 1 μ g/ml de pFSH, 1 μ g/ml de 17β -estradiol y cisteamina 100 μ M (de Matos y col., 1995). Los complejos cúmulo-ovocitos (COCs) fueron cultivados durante 24 hs en gotas de 50 μ l de medio de IVM bajo aceite mineral a 39°C en atmós-

fera de 5% CO₂, 7% O₂ y 88% N₂, con saturación de humedad.

Fertilización *in vitro*: luego de la maduración, los COCs fueron incubados durante 22 h en gotas de 50 μ l de medio de fertilización *in vitro* bajo aceite mineral, con una concentración de 1×10^6 /ml de espermatozoides seleccionados mediante el procedimiento de Percoll (Parrish y col., 1986). Como medio de fertilización *in vitro* se empleó TALP combinado con 6 mg/ml de BSA-FAF, penicilamina 20 μ M, hipotaurina 10 μ M, y 10 μ g/ml de heparina. El medio TALP fue compuesto según fuera descrito por Parrish y col (1986).

Cultivo *in vitro*: los supuestos cigotos fueron transferidos al medio *synthetic oviduct fluid* modificado (SOFm; Tervit y col., 1972; Edwards y col., 1997) combinado con glutamina 1 mM, 2% (v/v) de BME, 1% (v/v) de MEM y 4 mg/ml de BSA-FAF (274 a 276 mOsm/l) y cultivados durante 48 hs, en gotas de 40 μ l bajo aceite mineral (10 embriones por gota), a 39°C en atmósfera de 5% CO₂, 7% O₂ y 88% N₂, con saturación de humedad. Al cabo de 48 hs, los embriones fueron transferidos al mismo medio, pero conteniendo glucosa 1,5 mM (Furnus y col., 1997) e incubados en las mismas condiciones durante 5 días. El medio de cultivo fue cambiado cada 48 hs.

Los embriones fueron clasificados de acuerdo a su estadio de desarrollo y su morfología (Lindner y Wright, 1984). Sólo se emplearon en los experimentos blastocistos en expansión y expandidos de calidad excelente y buena. Los embriones obtenidos en los Días 6 y 7 (generalmente 10 a 20 embriones por día) fueron asignados aleatoriamente a los diferentes tratamientos dentro de cada experimento.

Producción de embriones bovinos obtenidos *in vivo*

Superovulación e inseminación de las donantes: como donantes de embriones se emplearon vacas Hereford adultas (edad: 4 a 8 años; peso corporal promedio \pm DS: 574 \pm 40 kg). Las donantes fueron divididas en grupos de 4 animales. En cada grupo el estro fue sincronizado por medio de un dispositivo intravaginal (CIDR) conteniendo 1,9 g de progesterona (se consideró Día 0 el día de la inserción del CIDR) y 5 mg de 17- β estradiol, i.m. 12 hs después de la inserción del CIDR.

El tratamiento de superestimulación fue iniciado el Día 4 utilizando FSH (Folotropin-V) reconstituida según las indicaciones del proveedor y de acuerdo al siguiente esquema:

Día 4: 2,5 ml por la mañana, 2 ml 12 hs después.

Día 5: 2 ml por la mañana, 1,5 ml 12 hs después.

Día 6: 1,5 ml por la mañana, 1 ml 12 hs después.

Día 7: 1 ml por la mañana, 0,5 ml 12 hs después.

En el Día 6 las donantes recibieron también 2 ml de Cloprostenol (análogo de prostaglandina F₂alfa), i.m., y el CIDR fue retirado en la tarde del mismo día. El Día 8 se administraron 2,5 ml de GnRH (Receptal), i.m. En la mañana y la tarde de los Días 7, 8 y 9 se realizó la detección de celo durante 30 minutos por observación de la conducta de monta. Aquellos animales que mostraron celo recibieron inseminación artificial 12 hs después.

Recolección y evaluación de los embriones: los embriones fueron recolectados en forma no quirúrgica seis días después de la detección del celo. Para este propósito fueron lavados ambos cuernos uterinos con DPBS combinado con 1% de SFB y 1% de AA. Los embriones fueron buscados bajo lu-

pa e inmediatamente colocados en medio de mantenimiento, consistente en DPBS combinado con 10% de SFB y 1% de AA.

Los embriones fueron clasificados de acuerdo a su estadio de desarrollo y su morfología (Lindner y Wright, 1984). Solo fueron empleados en los experimentos aquellas mórulas compactas o blastocistos de calidad buena o excelente. Los embriones recolectados cada día (usualmente 20 a 30) fueron asignados aleatoriamente a los diferentes tratamientos dentro de cada experimento.

Protocolos de vitrificación

Todas las soluciones utilizadas en los protocolos de criopreservación se realizaron en una solución base consistente en DPBS combinado con 10% de SFB y 1% de AA. En todos los tratamientos los embriones fueron cargados individualmente en pajuelas de 0,25 ml (IMV, L'Aigle, Francia). Una vez criopreservados los embriones fueron almacenados en nitrógeno líquido durante 6 a 12 meses hasta la transferencia.

Vitrificación con propilenglicol + glicerol (Pg+Gli): se empleó el protocolo de vitrificación descrito por Scheffen y col. (1986) y Massip y col. (1986), con modificaciones. Este protocolo emplea glicerol y propilenglicol como crioprotectores para componer la solución de vitrificación (glicerol 25% + propilenglicol 25%). Antes de sumergir los embriones en la solución de vitrificación éstos son colocados en una solución de equilibrado (glicerol 10% + propilenglicol 20%). La remoción del crioprotector se realiza en dos pasos empleando sacarosa 1 M.

Vitrificación con etilenglicol + Ficoll 70 + sacarosa (EFS): se empleó el protocolo de vitrificación descrito por Kasai y col. (1990), modificado por Zhu y col. (1993). Este protocolo emplea etilenglicol, Ficoll 70

y sacarosa como crioprotectores para componer la solución de vitrificación (etilenglicol 40% + Ficoll 70 18% + sacarosa 0,3 M). Antes de sumergir los embriones en la solución de vitrificación éstos son colocados en una solución de equilibrado (etilenglicol 20%). La remoción del crioprotector se realiza en un paso empleando sacarosa 0.5 M.

Vitrificación con la solución EFS modificada (EFSm): se realizó una modificación del protocolo EFS descrito en la sección anterior. La variante consistió en equilibrar los embriones en dos pasos, antes de ser vitrificados (etilenglicol 10% y luego etilenglicol 20%).

Vitrificación con etilenglicol + glicerol (Eg+Gli): se empleó, con modificaciones, el protocolo de vitrificación descrito por Yang y col. (1992), el cual fue desarrollado como una modificación del protocolo Pg+Gli. Este protocolo emplea etilenglicol y glicerol como crioprotectores para componer la solución de vitrificación (glicerol 25% + etilenglicol 25%). Antes de sumergir los embriones en la solución de vitrificación éstos son colocados en dos soluciones de equilibrado (glicerol 10% y luego glicerol 10% + etilenglicol 20%). La remoción del crioprotector se realiza en tres pasos empleando concentraciones decrecientes de sacarosa.

Evaluación *in vitro* de la sobrevivencia embrionaria luego de la criopreservación

La evaluación *in vitro* de los embriones descongelados se realizó, luego de la remoción del crioprotector, mediante el cultivo de los mismos en gotas de 50 µl de SOFm adaptado de acuerdo a lo descrito anteriormente (5 a 7 embriones/gota).

El desarrollo, medido como la formación de blastocele (en las mórulas) o la re-expansión del mismo (en los blastocistos),

y la eclosión, fueron evaluados cada 24 hs hasta las 72 hs para estimar la viabilidad embrionaria. La tasa de desarrollo fue calculada como el cociente entre el número de embriones que formaron o expandieron el blastocele y el número de embriones colocados en cultivo, mientras que la tasa de eclosión fue calculada como el número de embriones que eclosionaron sobre el número de embriones colocados en cultivo.

Finalmente, en los experimentos donde se realizó el recuento del número de núcleos de aquellos blastocistos que sobrevivieron luego de 72 hs de cultivo, se empleó para marcar los núcleos el marcador fluorescente específico para ADN Hoechst 33342, observándolos mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon Optiphot (Nikon Co., Tokio, Japón; de Matos y col., 1995).

Evaluación *in vivo* de la sobrevivencia embrionaria luego del criopreservación

La evaluación de los tratamientos de criopreservación también se realizó por transferencia a receptoras. Se emplearon para ello vacas adultas Polled Hereford (edad: 4 a 6 años; peso corporal promedio \pm DS: 398 \pm 30 kg). El celo fue sincronizado empleando una única dosis i.m. de 2 ml de Cloprostenol. Siete días después de la detección del estro los embriones fueron transferidos en forma no quirúrgica (1 embrión por receptora) en el cuerno uterino ipsilateral al cuerpo lúteo usando un catéter de transferencia de embriones bovinos (I.M.V., L'Aigle, Francia).

La preñez fue diagnosticada 30 días después de la transferencia mediante una ecografía transrectal empleando un ecógrafo Aloka 500 (Aloka, Tokio, Japón) con un transductor lineal de 7,5 MHz. Quince días antes de la fecha estimada de parto las receptoras preñadas fueron separadas y mantenidas en co-

rrales. Durante el período de nacimientos el grupo fue controlado dos veces por día para registrar los partos distócico.

Se definió la tasa de preñez como el cociente entre el número de receptoras preñadas y el número de receptoras que recibieron embrión y tasa de nacimientos como el cociente entre el número de terneros nacidos y el número de receptoras que recibieron embrión. La tasa de partos distócicos fue calculada como el cociente entre el número de partos distócicos y el número total de partos. La relación de sexos fue calculada como el cociente entre el número de machos y hembras nacidas, y la duración de la gestación como el intervalo de tiempo entre las fechas de transferencia y nacimiento, más 6 días (considerada la edad embrionaria).

Análisis estadístico

Las diferencias en las tasas de desarrollo, eclosión, preñez, nacimientos y partos distócicos y las relaciones de sexos fueron analizadas empleando el *test* Exacto de Fisher.

Las diferencias en el número de núcleos, duración de la gestación y peso al nacimiento fueron analizados mediante el *test* de T o ANOVA, según correspondiera.

Los valores de probabilidad menores que 0,05 fueron considerados como significativos.

Todos los *tests* fueron realizados empleando el programa *Statistica* para *Windows* (Stat Soft Inc., 1999).

Resultados

Se procesó un total de 5.088 ovocitos, de los cuales clivaron luego de la fertilización 3.796 (74,6%) y 1.041 de ellos alcanzaron el estadio de blastocisto (27,4%). En los experimentos se empleó un total de 829 blastocistos, y 212 no fueron incluidos en los experimentos debido de su mala calidad.

Efecto de la vitrificación con las soluciones Pg+Gli y EFS en la sobrevida *in vitro* de embriones bovinos obtenidos *in vitro*:

Se emplearon 244 embriones para comparar la sobrevida *in vitro* luego de la vitrificación, 120 de los cuales fueron vitrificados con la solución Pg+Gli y 124 con EFS.

Los embriones vitrificados con EFS alcanzaron tasas de desarrollo y eclosión más altas que aquellos vitrificados con Pg+Gli, tanto en el grupo de Día 6 como en el de Día 7. También fueron significativas las diferencias cuando se comparó la suma de los resultados de los embriones de Día 6 + Día 7. No se observaron diferencias significativas tanto en las tasas de desarrollo como de eclosión en la vitrificación de embriones de Día 6 y Día 7 dentro de cada método de vitrificación (Tabla I).

Tabla I. Tasas de desarrollo y de eclosión de embriones bovinos obtenidos *in vitro* vitrificados con Pg+Gli y EFS.

	Tratamientos	Día 6 (%)	Día 7 (%)	Día 6 + Día 7 (%)
Desarrollo	Pg+Gli	14/44 (31,8) ^a	26/76 (34,2) ^a	40/120 (33,3) ^a
	EFS	28/46 (60,8) ^b	42/78 (53,8) ^b	70/124 (56,4) ^b
Eclosión	Pg+Gli	6/44 (13,6) ^a	10/76 (13,1) ^a	16/120 (13,3) ^a
	EFS	18/46 (39,1) ^b	26/78 (33,3) ^b	44/124 (35,4)

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocite/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados. Los valores con superíndices distintos dentro de la columna difieren significativamente (P<0,05).

También se encontraron diferencias significativas en el promedio del número de núcleos de aquellos embriones que sobrevivieron a la vitrificación (Tabla II).

Tabla II. Número de núcleos de embriones bovinos obtenidos *in vitro* vitrificados con las soluciones Pg+Gli y EFS.

Tratamientos	N	Número de núcleos
Pg+Gli	40	98,4±30,4 ^a
EFS	70	119,7±42,5 ^b

Los valores están expresados como el promedio del número de núcleos, con el desvío estándar. Los valores con superíndices distintos difieren significativamente ($P<0,05$).

Efecto de la vitrificación con las soluciones EFS, EFSm y Eg+Gli en la sobrevida *in vitro* de embriones bovinos obtenidos *in vitro*:

Tabla III. Tasas de desarrollo y de eclosión de embriones bovinos obtenidos *in vitro* vitrificados con EFS, EFSm o Eg+Gli.

	Tratamientos	Día 6 (%)	Día 7 (%)	Día 6 + Día 7 (%)
Desarrollo	EFS	24/48 (50,0) ^a	47/75 (62,6) ^a	71/123 (57,7) ^a
	EFSm	32/49 (65,3) ^a	50/74 (67,5) ^a	82/123 (66,6) ^a
	Eg+Gli	33/49 (67,3) ^a	48/75 (64,0) ^a	81/124 (65,3) ^a
Eclosión	EFS	14/48 (29,1) ^a	30/75 (40,0) ^a	44/123 (35,7) ^a
	EFSm	25/49 (51,0) ^b	46/74 (62,1) ^b	71/123 (57,7) ^b
	Eg+Gli	31/49 (63,2) ^b	43/75 (57,3) ^b	74/124 (59,6) ^b

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocelo/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados. Los valores con superíndices distintos dentro de la columna difieren significativamente ($P<0,05$).

Por otra parte las soluciones EFSm y Eg+Gli tuvieron un número promedio de núcleos significativamente mayor que la solución EFS (Tabla IV).

Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la vitrificación sobre embriones bovinos obtenidos *in vitro*:

Se evaluó la sobrevida *in vitro* de los embriones luego de la vitrificación con la solución Eg+Gli, la cual fue combinada con diferentes concentraciones de sacarosa.

Se emplearon 370 embriones para comparar la sobrevida *in vitro* luego de la vitrificación, 123 de los cuales fueron vitrificados con EFS, 123 con EFSm y 124 con Eg+Gli.

No hubo diferencias significativas en las tasas de desarrollo entre las soluciones. Con respecto a las tasas de eclosión, EFSm y Eg+Gli alcanzaron valores más altos que EFS en la evaluación en los embriones de Día 6, Día 7 y Día 6 + Día 7. Fueron también significativas las diferencias entre los embriones de Día 6 vitrificados con EFS y Eg+Gli. Sin embargo, no hubo diferencias en las tasas de desarrollo y eclosión entre los embriones bovinos obtenidos *in vitro* de Día 6 y Día 7 dentro de cada tratamiento (Tabla III).

Tabla IV. Número de núcleos de embriones bovinos obtenidos *in vitro* vitrificados con EFS, EFSm o Eg+Gli.

Tratamientos	N	Número de núcleos
EFS	44	115,1±35,7 ^a
EFSm	71	131,8±48,0 ^b
Eg+Gli	74	133,3±40,1 ^b

Los valores están expresados como el promedio del número de núcleos, con el desvío estándar. Los valores con superíndices distintos difieren significativamente ($P<0,05$).

Se emplearon 480 embriones, 120 de los cuales fueron vitrificados con Eg+Gli, 120 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,1 M, 120 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,3 M y 120 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,5 M.

No hubo diferencias significativas en las tasas de desarrollo entre las soluciones.

La tasa de eclosión mostró que el agregado de sacarosa 0,1 ó 0,3 M resultó beneficiosa, efecto que se revirtió cuando la concentración de sacarosa fue mayor (0,5 M). No hubo diferencias en las tasas de desarrollo y eclosión en la comparación entre los embriones de Día 6 y Día 7 dentro de cada tratamiento (Tabla V).

Tabla V. Tasa de desarrollo y eclosión de embriones bovinos obtenidos *in vitro* vitrificados con la solución Eg+Gli combinado con diferentes concentraciones de sacarosa.

	Concentración de sacarosa	Día 6 (%)	Día 7 (%)	Día 6+7 (%)
Desarrollo	0 M	42/62 (67,7) ^a	45/58 (77,5) ^a	87/120 (72,5) ^a
	0,1 M	42/64 (65,6) ^a	44/56 (78,6) ^a	86/120 (71,6) ^a
	0,3 M	46/62 (74,2) ^a	36/58 (62,1) ^a	82/120 (68,3) ^a
	0,5 M	36/62 (58,1) ^a	37/58 (63,7) ^a	73/120 (60,8) ^a
Eclosión	0 M	29/62 (46,7) ^{ac}	26/58 (44,8) ^a	55/120 (45,8) ^a
	0,1 M	42/64 (65,6) ^b	38/56 (67,8) ^b	80/120 (66,6) ^b
	0,3 M	40/62 (64,5) ^{ab}	32/58 (55,1) ^{ab}	72/120 (60,0) ^b
	0,5 M	28/62 (45,1) ^c	26/58 (44,8) ^a	54/120 (45,0) ^a

Los valores están expresados como el cociente entre los embriones que re-expandieron el blastocelo/total de los embriones criopreservados y los embriones que eclosionaron/total de los embriones criopreservados. Valores con diferentes superíndices dentro de las columnas difieren significativamente ($P < 0,05$).

Cuando se analizó el número de núcleos se observó un efecto beneficioso experimentado por el grupo en el que se agregó sacarosa 0,1 M a la solución Eg+Gli (Tabla VI).

Efecto de la vitrificación en la sobrevida luego de la transferencia de embriones bovinos obtenidos *in vitro*:

Se emplearon 343 embriones obtenidos *in vitro*, 80 fueron vitrificados con la solución EFSm, 81 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,1 M, 82 con Eg+Gli combinado con sacarosa 0,3 M y 100 fueron usados como control fresco. Además, 100 embriones obtenidos *in vivo* fueron transferidos como control.

Tabla VI. Número de núcleos de embriones bovinos obtenidos *in vitro* vitrificados con Eg+Gli combinado con diferentes concentraciones de sacarosa.

Concentración de sacarosa	N	Número de núcleos
0 M	87	92,7±36,0 ^a
0,1 M	86	127,4±49,4 ^b
0,3 M	82	111,4±48,4 ^{ab}
0,5 M	73	99,6±39,4 ^a

Los valores están expresados como el promedio del número de núcleos, con el desvío estándar. Los valores con superíndices distintos difieren significativamente ($P < 0,05$).

Tanto las tasas de preñez como las tasas de nacimientos fueron significativamente mayores para los embriones obtenidos *in vivo* que para los obtenidos *in vitro*, cualquiera fuera el tratamiento. Las tasas de preñez y nacimientos de todos los tratamientos que emplearon embriones obtenidos *in vitro* fueron iguales (Tabla VII).

No hubo diferencias significativas en la duración de la gestación y la proporción

de sexos entre los tratamientos. Hubo diferencias significativas entre el peso al nacimiento de los embriones obtenidos *in vivo* con respecto a los obtenidos *in vitro* (Tabla VIII).

Hubo una incidencia significativamente mayor de partos distócicos entre el grupo de receptoras que recibieron embriones obtenidos *in vitro* (Tabla IX). Pese a ello no se registraron muertes de terneros.

Tabla VII. Transferencia de embriones bovinos transferidos en fresco o vitrificados.

	Tratamientos				
	Fresco in vivo (%)	Fresco in vitro (%)	EFSm (%)	Eg+Gli + Sac. 0,1 M (%)	Eg+Gli + Sac. 0,3 M (%)
Tasa de preñez	75/100 (75,0) ^a	51/100 (51,0) ^b	32/80 (40,0) ^b	40/81 (49,4) ^b	41/82 (50,0) ^b
Tasa de nacimientos	75/100 (75,0) ^a	49/100 (49,0) ^b	28/80 (35,0) ^b	40/81 (49,4) ^b	38/82 (46,3) ^b

Sac = Sacarosa

Valores con diferentes superíndices dentro de las filas difieren significativamente (P<0,05).

Tabla VIII. Longitud de la gestación, peso al nacimiento y proporción de sexos después de la transferencia de embriones bovinos transferidos en fresco o vitrificados.

Tratamientos	Longitud de la gestación (días)	Peso al nacimiento (kg)	Proporción de sexos (m:h)
Fresco <i>in vivo</i>	284,0±1,5 ^a	35,5±3,0 ^a	40:35 ^a
Fresco <i>in vitro</i>	283,1±1,3 ^a	39,1±2,0 ^b	25:24 ^a
EFSm	285,1±3,3 ^a	39,1±2,0 ^b	14:14 ^a
Eg+Gli + Sac. 0,1 M	282,8±1,4 ^a	41,2±3,8 ^b	22:18 ^a
Eg+Gli + Sac. 0,3 M	283,0±1,4 ^a	39,1±2,2 ^b	21:17 ^a

Sac = Sacarosa

Los valores están expresados como los promedios del longitud de la gestación y peso al nacimiento, con el desvío estándar. Los valores con diferentes superíndices dentro de la columna difieren significativamente (P<0,05).

Discusión

Cuando se vitrificó con la solución EFS a los blastocistos obtenidos *in vitro*, se obtuvieron mejores resultados que cuando se empleó la solución de vitrificación Pg+Gli, tanto en la evaluación de las tasas de desarrollo y de eclosión como en el número promedio de núcleos. Este hecho puede ser explicado por la mayor permeabilidad del etilenglicol en la membrana celular de los embriones comparado con el propilenglicol y el glicerol (Palasz y Mapletoft, 1996). Además, la sacarosa y el Ficoll 70 (crioprotectores no permeables) confieren un efecto protector adicional a la solución EFS, mientras que Pg+Gli no posee crioprotectores no permeables en su formulación. La sacarosa causa la deshidratación del embrión, con lo cual reduce la probabilidad de formación de hielo intracelular y aumenta la concentración de macromoléculas en el citoplasma, facilitando de esa forma la vitrificación intracelular (Rall, 1987), mientras que el uso de Ficoll 70 como una macromolécula facilita la vitrificación y previene la formación de hielo extracelular durante la vitrificación y el proceso de descongelamiento (Fahy y col., 1984; Kasai y col., 1990). Estos resultados confirman hallazgos previos según los cuales la adición de azúcares tales como sacarosa, dextrosa o trealosa, y macromoléculas tales como polietilenglicol, Ficoll 70 y polivinilpirrolidona mejoraban la sobrevida *in vitro* de los blastocistos después de la vitrificación (Ohboshi y col., 1997; Saha y col., 1996; Saito y col., 1994).

No hubo diferencias en las tasas de desarrollo entre las tres soluciones de vitrificación utilizadas: EFS, EFSm y Eg+Gli. Sin embargo, la tasa de eclosión y el número promedio de núcleos de los embriones vitrificados con la solución EFS (1 paso de equilibrado) fueron menores que la de aquellos vitrificados con las soluciones EFSm y Eg+Gli (ambas emplearon 2 pa-

sos de equilibrado). Una diferencia esencial mostró estar relacionada con el número de pasos y/o la concentración del crioprotector en los pasos antes de la vitrificación más que con la combinación de los crioprotectores. Estos resultados son similares a aquellos reportados en trabajos previos, donde se mostró que un incremento en el número de pasos de equilibrado antes de la inmersión final en la solución de vitrificación fue acompañado por un incremento de la sobrevida embrionaria luego de la remoción del crioprotector (Darvedil y col., 1994; Kuwayama y col., 1992; Mahmoudzadeh y col., 1995; Ohboshi y col., 1997).

No se encontraron diferencias en las tasas de desarrollo entre los tratamientos en los que se varió la concentración de sacarosa adicionada a la solución Eg+Gli. Sin embargo, el uso de la solución Eg+Gli combinado con sacarosa 0,1 y 0,3 M mostró tasas de eclosión y promedio del número de núcleos mayores que las soluciones Eg+Gli sin sacarosa y con sacarosa 0,5 M. La sacarosa confiere un efecto protector adicional debido a que este crioprotector no permeable provoca la deshidratación del embrión, con lo cual reduce la probabilidad de formación de hielo intracelular y provoca una concentración de las macromoléculas del citoplasma, facilitando la vitrificación intracelular (Rall, 1987). Estos resultados confirman los hallazgos previos sobre una mejora en la sobrevida *in vitro* de los blastocistos luego de la vitrificación con adición de azúcares tales como la sacarosa, dextrosa y trealosa (Saito y col., 1994). Sin embargo, sólo el uso de bajas concentraciones de sacarosa (0,1 y 0,3 M) tiene un efecto positivo, por cuanto una concentración más alta (0,5 M) resultó en menores tasas de eclosión. Esto coincide con estudios previos (Leibo, 1984; McWilliams y col., 1991; Somgsasen y col., 1995; Széll y Shelton, 1986) que sugieren que el uso de concentraciones altas de sacarosa como un

buffer osmótico tiene efectos adversos sobre los embriones congelados y descongelados, los cuales podrían ser permeables a los solutos.

En ninguno de los experimentos analizados hasta aquí se encontraron diferencias significativas al comparar las tasas de sobrevida de los embriones obtenidos en Día 6 y Día 7. Por lo tanto, podemos concluir que, sin importar el día de cultivo, en nuestro sistema de producción *in vitro* de embriones bovinos el comportamiento de los blastocistos en presencia de las soluciones de vitrificación fue similar. Muchos estudios han reportado diferencias en la criopreservación de blastocistos obtenidos en diferente día de cultivo (Hasler y col., 1995; Hasler y col., 1997; Mahmoudzadeh y col., 1995; Massip y col., 1995; Ohboshi y col., 1997; Saha y Suzuki 1997; Vajta y col., 1996). El uso de diferentes sistemas de cultivo provee condiciones específicas necesarias para la producción del embrión. Asimismo, las características morfológicas y bioquímicas del embrión después del cultivo están condicionadas por el sistema de cultivo empleado (Kaidi y col., 1998; Massip y col., 1995; Ohboshi y col., 1997; Pugh y col., 1998; Yamashita y col., 1999), y esto podría explicar muchas diferencias en los resultados obtenidos en estudios previos.

Las tasas de preñez y nacimientos de los embriones obtenidos *in vivo* fueron mayores que las de aquellos obtenidos *in vitro*, lo cual está relacionado con la menor robustez de estos últimos (Greve y col., 1993; Massip y col., 1995). Al comparar entre sí los tratamientos que involucraron a los embriones obtenidos *in vitro* se observó que tanto aquellos que fueron transferidos en fresco como los que fueron vitrificados consiguieron tasas de éxito similares. Estos resultados coinciden con trabajos previos realizados también con embriones bovinos, pero con otros protocolos de criopre-

servación (Massip y col., 1995; Tachikawa y col., 1993).

No hubo diferencias entre los tratamientos ni en la duración de la gestación ni en la proporción de sexos. El peso al nacer de los terneros obtenidos a partir de embriones obtenidos *in vitro* fue mayor que el de los obtenidos a partir de los embriones obtenidos *in vivo*. El incremento en el peso condujo a un incremento significativo del número de partos distócicos. Este hecho ha sido reportado previamente (Farin y Farin 1997; Walker y col., 1996). La obtención de terneros inusualmente grandes a partir de los embriones obtenidos *in vitro* podría ser un factor limitante para el uso de este tipo de embriones en programas comerciales.

Nuestros resultados coinciden parcialmente con un importante estudio de campo (Van Wagendonk-De Leeuw y col., 1998) donde se compararon los terneros obtenidos luego de la transferencia de embriones bovinos obtenidos *in vitro* con aquellos obtenidos por inseminación artificial. En dicho estudio se obtuvieron más machos a partir de embriones obtenidos *in vitro* y la duración de la gestación fue mayor, en contraste con lo observado en el presente estudio. Sin embargo, ambos estudios coinciden en que los terneros obtenidos a partir de los embriones obtenidos *in vitro* fueron más pesados que aquellos obtenidos *in vivo*.

En un estudio previo realizado por nuestro grupo (de Matos y col., 1995) se encontró que los blastocistos de Día 6 congelados con glicerol mostraron mayores tasas de sobrevida *in vitro* post-descongelamiento que aquellos obtenidos en el Día 7. En el presente estudio la edad de los embriones en el momento de la vitrificación no tuvo efecto en la sobrevida *in vitro*, sugiriendo que la vitrificación podría ser más

adecuada que el congelamiento lento para la criopreservación de los embriones bovinos obtenidos *in vitro*.

Estos resultados muestran que la vitrificación puede ser usada con éxito en la criopreservación de embriones producidos *in vitro* y que podría ser considerada para su uso en programas comerciales.

Referencias

- Bols, P.E.J;** Vandenheede, J.M.M; Van Soom, A; y col. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology* 43: 677-687, 1995a.
- Darvedil, U;** Gustafsson, H; Shamsuddin, M; y col. Survival rate and ultrastructure of vitrified bovine *in vitro* and *in vivo* developed embryos. *Acta Vet. Scandinavica* 35: 417-426, 1994.
- De Matos, D.G;** Furnus, C.C; Moses, D.F; y col. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 432-436, 1995.
- Edwards, L.J;** Batt, P.A; Gandolfi, F; y col. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 146-154, 1997.
- Fahning, M.L;** García, M.A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 29: 1-18, 1992.
- Fahy, G.M;** Mac Farlane, D.R; Angell, C.A; y col. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21: 407-426, 1984.
- Farin, P.W;** Farin, C.E. Perspectives on large calves following transfer of embryos produced *in vitro*. *Embryo Transfer Newsletter* 15: 15-19, 1997.
- Furnus, C;** de Matos, D; Martínez, A.G; y col. Effect of glucose on embryo quality and post-thaw viability of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 47: 481-490, 1997.
- Greve, T; Avery, B; Callensen, H. Viability of *in-vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 28: 164-169, 1993.
- Hasler, J.F; Henderson, W.B; Hurtgen, P.J; y col. Production freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141-152, 1995.
- Hasler, J.F;** Hurtgen, P.J; Jin, Z.Q; y col. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* 48: 563-579, 1997.
- Kaidi, S;** Donnay, I; Massip, A; y col. Osmotic behaviour of *in vitro* produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology* 41: 106-115, 2000.
- Kaidi, S;** Donnay, I; Van Langendonck, A; y col. Comparison of two co-culture systems to assess the survival of *in vitro* produced bovine blastocysts after vitrification. *Anim. Reprod. Sci.* 52: 39-50, 1998.
- Kasai, M;** Komi, J.H; Takakamo, A; y col. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.* 89: 91-97, 1990.
- Kuwayama, M;** Hamano, S; Nagai, T. Vitrification of bovine blastocysts obtained by *in-vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in-vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 96: 187-193, 1992.
- Leibo, S.P;** Loskutoff, N.M. Cryobiology of *in-vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology* 39: 81-94, 1993.
- Leibo, S.P.** A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21: 767-790, 1984.
- Lindner, G.M;** Wright, R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20: 407-415, 1984.
- Mahmoudzadeh, A.R;** Van Soom, A; Bols, P; y col. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in-vitro*: Effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *J. Reprod. Fertil.* 103: 33-39, 1995.
- Mahmoudzadeh, A.R;** Van Soom, A; Ysebaert, M.T; y col. Comparison of 2-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in-vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology* 42: 1389-1397, 1994.
- Massip, A;** Mermillod, P; Dinnyès, A. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: Implications for their cryopreservation. *Hum. Reprod.* 10: 3004-3011, 1995.
- Massip, A;** Mermillod, P; Wils, C; y col. Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced *in-vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 97: 65-69, 1993.
- Massip, A;** Van der Zwalm, P; Scheffen B; y col. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo Letters*, 7: 270-273, 1986.
- McWilliams, R.B;** Gibbons, W.E; Leibo, S.P. Osmotic responses of mouse and human ova in permeating and nonpermeating solutes. *Cryobiology* 28: 523 abstr, 1991.
- Niemann, H.** Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology* 1991, 35: 109-124, 1991.
- Ohboshi, S;** Fujihara, N, Yoshida, T; y col. Usefulness of polyethylene glycol for cryopreservation by vitrification of *in vitro* derived bovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 27-36, 1997.
- Palasz, A.T;** Gustafsson, H; Rodriguez-Martínez, H; y col. Vitrification of bovine IVF blastocysts in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. *Theriogenology* 47: 865-879, 1997.

- Palasz, A.T.**; Mapletoft, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnologies Advances* 14: 127-149, 1996.
- Parrish, J.J.**; Susko-Parrish, J; Leibfried-Rutledge, M.L; y col. Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 25: 591-600, 1986.
- Pugh, P.**, Ankersmit, A; Mc Gowan, L; y col. Cryopreservation of in-vitro bovine embryos: Effect of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology* 50: 495-506, 1998.
- Rall, W.F.** Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24: 387-402, 1987.
- Saha, S.**; Otoi, T; Takagi, M; y col. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol trehalose and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33: 291-299, 1996.
- Saha, S.**; Suzuki, T. Vitrification of in vitro produced bovine embryos at different ages using one- and three step addition of cryoprotective additives. *Reprod. Fertil. Dev.* 9: 741-746, 1997.
- Saito, N.**, Imai, K; Tomizawa, M. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in-vitro. *Theriogenology* 41: 1053-1060, 1994.
- Scheffen B.**; Van der Zwalmen, P, Massip, A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo Letters*, 7: 260-269, 1986.
- Somgsasen, N.**, Buckrell B.C; Plante, C; y col. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. *Cryobiology* 32: 78-91, 1995.
- Sommerfeld, V.**, Niemann, H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 38: 95-105, 1999.
- Suzuki, T.**; Takagi, M; Yamamoto, M; y col. Pregnancy rate and survival in culture of in-vitro fertilized bovine embryos frozen in various cryoprotectants and thawed using a one-step system. *Theriogenology* 40: 651-659, 1993.
- Szell, A.**; Shelton, J.N. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen. *J. Reprod. Fertil.* 76: 401-408, 1986.
- Tachikawa, S.**; Otoi, T; Kondo, S; y col. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in-vitro maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 266-271, 1993.
- Tervit, H.R.**; Whittingham DG; Rowson, L.E.A. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 30: 493-497, 1972.
- Vajta, G.**; Holm, P; Greve, T; y col. Factors affecting survival of in-vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim. Reprod. Sci.* 45: 191-200, 1996.
- Vajta, G.**; Holm, P; Greve, T; y col. Survival and development of bovine blastocysts produced in vitro after assisted hatching, vitrification and in straw rehydration. *J. Reprod. Fertil.* 111: 65-70, 1997.
- Van Wagtendonk-De Leeuw, A.M.**; Aerts B.J.G; Den Daas, J.H.G. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos - A field study. *Theriogenology* 49: 883-894, 1998.
- Walker, S.K.**; Hartwich, K.M; Seamark, R.F. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology* 45: 111-120, 1996.
- Wilmut, I.**, Rowson, L.E.A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Records*, 92: 686-690, 1973.
- Wurth, Y.A.**; Reinders, J.M.C; Rall, W.F; y col. Developmental potential of in-vitro produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. *Theriogenology* 42: 1275-1284, 1994.
- Yamashita, S.**; Satoh, T; Hoshi, H; y col. A serum-free culture system for efficient in vitro production of bovine blastocysts with improved viability after freezing and thawing. *Cytotechnology* 31: 121-129, 1999.
- Yang, NS.**; Lu, K.H; Gordon, I; y col. Vitrification of bovine blastocysts produced in-vitro. *Theriogenology* 37: 326 abstr, 1992.
- Zhu, S.E.**; Kasai, M; Otoge, H; y col. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solution. *J. Reprod. Fertil.* 98: 139-145, 1993.