



APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE VITRIFICACIÓN A OVULOS DE BOVINO MADURADOS IN VITRO

Por

JUAN JESUS ROA VIDAL

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**

1999.

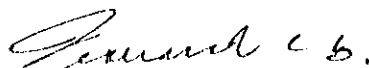
DR. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS
COORDINADOR DEL POSGRADO
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, CUCBA
PRESENTE

Por este conducto nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis realizado por el C. JUAN JESUS ROA VIDAL, con el título "APLICACIÓN DE LA TÉCNICA DE VITRIFICACIÓN A OVULOS DE BOVINO MADURADOS IN VITRO", consideramos que ha quedado debidamente incluido, por lo que ponemos a su disposición el escrito final para autorización de impresión y programación de fecha de examen de grado.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., 22 de junio de 1999.



DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE
DIRECTOR DE TESIS




DR. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ
ASESOR



DR. CARLOS BEAZ ZARATE
ASESOR



DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA
SINODAL



DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA
SINODAL

c.c.p. Coordinación del Posgrado del CUCBA.
c.c.p. Tesista.

La criopreservación como técnica de conservación se aplica a células somáticas y germinales de animales domésticos que muestran un alto valor genético de manera comercial.

Los avances en el estudio sobre criobiología han sentado las bases para comprender los efectos dañinos de la formación de cristales en óvulos y embriones de mamífero cuando estos son sometidos a congelamiento.

El objetivo principal de este estudio fue aplicar la técnica de vitrificación a óvulos de bovino madurados *in vitro*.

En el presente trabajo se utilizó una muestra de 51 ovarios de bovino de razas criollas de las cuales predominó la cruce con cebú. El material biológico incluyó ovarios tanto de vacas como de vaquillas. De los ovarios colectados se obtuvieron 443 ovocitos que fueron aspirados y madurados *in vitro* siguiendo la metodología de Ledezma (1991).

Los ovocitos se evaluaron de acuerdo a sus características morfológicas y de desarrollo (ovocitos inmaduros en estado de vesícula germinal) y (ovocitos en diferentes estados de maduración). En el primer grupo los ovocitos se vitrificaron, se maduraron *in vitro* y posteriormente se evaluaron. El segundo grupo de ovocitos se terminaron de madurar *in vitro*, se vitrificaron y se evaluaron. Para cada uno de los grupos se realizaron 3 ensayos.

Los resultados de ovocitos que sobrevivieron a la vitrificación y a la maduración *in vitro* en los tres ensayos fueron: 41.3%, 39.0% y 51.7% respectivamente, teniendo una media del 44.7%. Para los ovocitos que sobrevivieron a la maduración *in vitro* y vitrificación fueron: 63.8%, 64.3% y 68.4% teniendo una media de 65.7%.

Cuando se comparó estadísticamente los dos sistemas se encontró una diferencia significativa de ($p < 0.05$) con un 95% de confiabilidad por lo que se concluyó que la proporción de sobrevivencia es diferente empleando distintos sistemas, siendo más favorable para los óvulos que fueron madurados y posteriormente vitrificados.

**A MI ESPOSA Y AMIGA NORMA PLASENCIA DE ROA
POR SU AMOR Y COMPRENSION
POR TODO SU APOYO INCONDICIONAL PARA EL DESARROLLO
DE ESTA TESIS**

**A MI MADRE IRMA VIDAL DE ROA
POR SU AMOR Y PACIENCIA QUE SIEMPRE ME HA BRINDADO EN
CADA ETAPA DE MI VIDA**

A MIS AMIGOS:

LUIS ALFONSO GUERRERO QUIROZ

Y

ARMANDO AREVALO HERNANDEZ

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL DEPARTAMENTO DE MEDICINA
VETERINARIA DEL CENTRO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

INDICE

vi

CONTENIDO:	Página
RESUMEN.....	ii
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE ABREVIATURAS.....	ix
I.- ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.....	10
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
III.- HIPOTESIS.....	26
IV.- OBJETIVOS.....	27
V.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
VI.- RESULTADOS.....	42
VII.- DISCUSIÓN.....	62
VIII.-CONCLUSIÓN.....	69
IX.- BIBLIOGRAFÍA.....	70
ANEXO I.- PREPARACIÓN DE MEDIOS PARA MADURACIÓN DE OVULOS <i>IN VITRO</i> DE BOVINO.....	75
ANEXO II.- METODO DE PREPARACIÓN DE MEDIOS PARA CONGELACIÓN DE OVULOS DE BOVINO.....	79

INDICE DE TABLAS

vii

- 1.- Clasificación de ovocitos inmaduros
- 2.- Programa de congelación
- 3.- Colección de ovarios y ovocitos
- 4.- Clasificación de óvulos aspirados
- 5.- Evaluación de óvulos vitrificados en estado de vesícula germinal (VG)
- 6.- Evaluación de óvulos madurados *in vitro* y vitrificados
- 7.- Evaluación de óvulos madurados *in vitro*
- 8.- Supervivencia de óvulos vitrificados en el estado de metafase II
- 9.- Comparación de óvulos en estado de vesícula germinal y metafase II que sobrevivieron a la vitrificación antes y después de la maduración *in vitro*

- 1.- Ovocito de bovino madurado *in vitro* rodeado por células de la granulosa.
- 2.- Ovocito de bovino vitrificado en estado de vesícula germinal.
- 3.- Ovocito de bovino que sobrevivió a la maduración *in vitro* y vitrificación.
- 4.- Ovocito de bovino que no sobrevivió a la maduración *in vitro* y vitrificación.
- 5.- Ovocito de bovino vitrificado en estado de vesícula germinal con fallas en la expansión del espacio perivitelino y la formación de vesículas de agua.
- 6.- Ovocito de bovino vitrificado en estado de vesícula germinal y madurado *in vitro* con fallas en la organización de la membrana plasmática y una desorganización de la zona pelúcida.
- 7.- Ovocito de bovino madurado *in vitro* y vitrificado presentando irregularidades en diferentes zonas del ooplasma y membranas.
- 8.- Amplificación de la figura 7 donde se muestra el daño que se ocasiona a los óvulos al someterlos a compactación y descompactación en el proceso de vitrificación.
- 9.- Ovocito de bovino madurado *in vitro* y vitrificado con una buena respuesta a cambios morfológicas durante la congelación.
- 10.- Curva de descenso de temperatura del programa de vitrificación de óvulos de bovino *in vitro*.
- 11.- Diagrama de flujo de la metodología para maduración y vitrificación de ovocitos de bovino *in vitro*.

INDICE DE ABREVIATURAS

xi

GVBD.- Ovocito en estado de vesícula germinal en arresto nuclear.

NL2.- Nitrógeno líquido.

DMSO.- Dimetilsulfóxido.

LH.- Hormona luteinizante.

FSH.- Hormona folículo estimulante.

M-PBS.- Solución bufer de fosfatos.

GV.- Vesícula germinal.

MET-I.- Metafase I.

MET-II.- Metafase II.

TCM-199.- Medio de cultivo básico para óvulos y embriones.

SFB.- Suero fetal bovino.

SVE.- Suero de vaca en estro.

CCO.- Complejo cummulus ovocito.

TALP-HEPES.- Medio básico para lavar gametos.

Ham-F10.- Medio de cultivo celular.

MIV.- Maduración *in vitro*.

COCs.- Complejo de células que acompañan al óvulo.

I.- ANTECEDENTES CIENTÍFICOS

A) BIOFÍSICA DE LAS BAJAS TEMPERATURAS (CRIOGENIA)

El término de enfriamiento, es el proceso de cambio de estado de un objeto o sustancia, producto de la extracción del calor o disminución de la temperatura. Este proceso encierra en sí, dos subprocesos; uno ligado a la disminución de la temperatura producto de la extracción del calor al exterior conocido como enfriamiento externo y otro donde se disminuye la temperatura o se mantiene pero sin extracción de calor al exterior conocido como enfriamiento interno (Efecto Joule-Thomson) (Suárez, 1997).

La criogenia es la técnica por la cual se generan y emplean temperaturas por abajo de los 120° K (denominación a partir de la XII conferencia del frío en 1971), “crio” que significa en griego frío y “genos” generación, es decir generación del frío.

Esta técnica cumple mas de 100 años desde el momento en que fueron realizados los primeros experimentos exitosos de licuefacción del oxígeno. Esta ventaja de licuefacción se empezó a utilizar en la Industria en los años 20 de este siglo. A partir de entonces, la criogenia se ha desarrollado como una rama de la Ciencia.

Los primeros trabajos en la física de las bajas temperaturas realizados por los químicos británicos Humphry Davy y Michael Faraday, entre 1823 y 1845, marcaron el camino para el desarrollo de la criogenia. Ellos generaron gases calentando una mezcla adecuada en un extremo de un tubo con forma de V invertida, el otro extremo se mantenía en una mezcla de hielo y sal para enfriarlo. La combinación de temperaturas reducidas y altas presiones hacía que el gas generado se licuara; al abrir el tubo, el liquido se evaporaba rápidamente y se enfriaba hasta el punto de ebullición. Evaporando a bajas presiones dióxido de carbono sólido mezclado con éter, Faraday obtuvo una temperatura de 163 °K (-110 °C) (Suárez, 1997).

Si un gas a temperatura moderada se expande a través de una válvula, su temperatura aumenta. Pero si su temperatura inicial está por debajo de la llamada temperatura de inversión, la expansión provoca una reducción de temperatura es lo que se llama efecto "Thomson". Las temperaturas de inversión del hidrógeno y el helio, dos gases criogénicos fundamentales, son extremadamente bajas y para lograr una reducción de temperatura por expansión, deben enfriarse primero por debajo de sus temperaturas de inversión, el hidrógeno mediante aire líquido y el helio mediante hidrógeno líquido. Generalmente, este método no logra la licuefacción de fases en un solo paso, pero encadenando los efectos en cascada, el físico francés Louis Paul Cailletet y el físico suizo Raoul Pierre Pictet, de forma independiente lograron producir en 1877 algunas gotas de oxígeno líquido. El éxito de estos investigadores marcó el final del concepto de gases permanentes y estableció la posibilidad de licuar cualquier gas mediante una compresión moderada a temperaturas inferiores a la temperatura de inversión.

Para realizar el proceso de enfriamiento externo mencionado arriba, hace falta un sistema externo con temperatura que se mantenga menor que el objeto al cual se va a enfriar para que así ocurra un intercambio de calor.

El proceso de intercambio de calor se realiza por sí solo sin gastar ningún trabajo cuando la temperatura del objeto es mayor que la temperatura del ambiente. Sin embargo, a temperaturas menores que la del ambiente el paso del calor debe ir de temperatura más baja hacia el ambiente, es decir, para que un cuerpo se enfríe debe ceder su calor al ambiente y este proceso espontáneo no es posible sin gastar un trabajo.

El proceso de enfriamiento interno está ligado a la disminución del valor de los parámetros termodinámicos intensivos, los cuales pueden ser la presión y la intensidad de los campos eléctricos y magnéticos. La menor temperatura en cualquier sistema criogénico se obtiene solo por el proceso de enfriamiento interno, es por ello, que al analizar cualquier sistema para alcanzar temperaturas criogénicas, la menor temperatura en ese sistema está dada por un proceso de enfriamiento interno.

Según la Ley de Nertz, para cualquier valor de parámetro externo del sistema se cumple que a temperatura del cero absoluto $T = 0^\circ \text{K}$ la entropía del sistema es $S = 0^\circ \text{K}$. Dicha base física del tal teorema esta dada por la disminución de la temperatura, el caos en el sistema disminuye y esto comienza a ocurrir cuando la energía de intercambio entre las moléculas es comparada con la energía del movimiento térmico de las mismas (K T).

Para lograr el enfriamiento de un objeto o sustancia se utiliza en general la siguiente secuencia de procesos teniendo en cuenta que la entropía de la sustancia depende de algún parámetro termodinámico intensivo.

1. - Isotérmicamente se cambia el parámetro intensivo en la dirección que la entropía disminuya (en este caso sobre el sistema se realiza un trabajo con desprendimiento de calor).
2. - Con entropía constante se cambia el parámetro intensivo en dirección contraria al paso anterior (el sistema entonces realiza un trabajo con entropía constante y por tanto disminuye la temperatura).

Repitiendo estos dos procesos, en un ciclo, se logra disminuir la temperatura del sistema, pero llega el momento en que la entropía es insensible al cambio en los parámetros intensivos del sistema. Por lo tanto el proceso de isoterma no logra indefinidamente disminuir la temperatura del sistema (Suárez, 1997).

B) APLICACIÓN DE LAS BAJAS TEMPERATURAS

La utilización de las técnicas criogénicas son muy amplias y en la actualidad los sistemas criogénicos destinados a emplear las bajas temperaturas se han tornado en un instrumento importante de avance en las diferentes áreas de la biología del desarrollo.

Entre las muchas aplicaciones industriales importantes de la criogenia está la producción a gran escala de oxígeno y nitrógeno a partir del aire. El oxígeno tiene múltiples usos, por ejemplo: en motores de cohetes, en los altos hornos, en sopletes de corte y soldadura o el de hacer posible el intercambio gaseoso de los tripulantes de naves espaciales y submarinos. El nitrógeno se emplea en la producción de amoníaco para fertilizantes o en la preparación de alimentos congelados que se enfrían con suficiente rapidez para impedir que se destruyan los tejidos celulares. Se utiliza también como refrigerante y para el transporte de alimentos congelados.

La criogenia ha hecho posible el transporte comercial de gas natural licuado. Sin la criogenia, la investigación nuclear carecería de hidrógeno y helio líquidos para los detectores de partículas y para los potentes electroimanes necesarios en los grandes aceleradores de partículas. Estos imanes también se emplean en la investigación de fusión nuclear. Algunos dispositivos infrarrojos, máseres y láseres también requieren temperaturas criogénicas.

La cirugía criogénica o criocirugía se emplea en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en esta, se destruye el tejido de forma selectiva congelándolo con una pequeña sonda criogénica. Una técnica similar también se ha empleado para destruir tumores cerebrales y detener el avance del cáncer de cuello uterino.

Se está empleando para la conservación de órganos, células sanguíneas, bacterias y virus para su estudio, además, en el desarrollo de bancos de germoplasma encaminados a preservar el material genético.

La criopreservación como técnica de conservación se ha estado aplicando a células somáticas y germinales de animales domésticos que muestran un alto valor del potencial genético desde hace más de 30 años de manera comercial.

Con los avances en los estudios en criobiología, se han sentado las bases para comprender los efectos dañinos de la formación de cristales en óvulos y embriones de mamífero cuando éstos son sometidos a congelamiento y descongelamiento (Douglas., 1990).

C) CONGELAMIENTO DE ÓVULOS Y EMBRIONES DE BOVINO

La criopreservación de óvulos de mamíferos es una parte importante en la reproducción asistida en animales de especies domésticas. Cientos de animales han sido producidos por transferencia de embriones sometidos a procesos criogénicos. Además se han creado bancos de germoplasma de espermatozoides y embriones, almacenándolos y manipulando su potencial genético para su comercialización.

En el campo de la preservación animal estas técnicas han sido de gran utilidad ya que proveen una alternativa para incrementar la diversidad genética de mamífero.

Las primeras aplicaciones de esta técnica a células germinales se inició en 1972 con los trabajos de Wittingham quien experimentó con embriones de ratón los procesos de congelamiento y descongelamiento, obteniendo como resultado la fractura de la estructura del embrión. Por lo que éste estudio determinó la búsqueda de técnicas alternativas para la criopreservación y obtención de embriones viables para su posterior implantación (Flemming et.al.,1972).

Durante los pasados 15 años, la criopreservación de embriones ha sido un procedimiento de rutina con el surgimiento de 16 laboratorios en el mundo, donde se han obtenido crías de especies silvestres y domésticas después de transferir embriones criopreservados, sin embargo, su progenie es baja y es afectada de manera adversa (Leibo et. al.,1996).

Varios estudios han mostrado que los procedimientos de congelamiento y descongelamiento de óvulos de bovino madurados in vitro son perjudiciales y solamente permiten la fertilización y el desarrollo en un rango muy reducido sin llegar a la etapa de blastocisto. Durante el procesamiento y congelamiento de óvulos o durante la recuperación de óvulos almacenados dentro de una solución fisiológica, ellos están expuestos a lesiones por varios factores, incluyendo:

(1) Toxicidad de crioprotectores; (2) Daño al enfriamiento; (3) Daño físico por cristales extracelulares; (4) Toxicidad por electrolitos concentrados; (5) Formación y crecimiento de cristales intracelulares; (6) Daño por fractura; (7) Expansión osmótica (kasai, 1996).

Suzuki y Otoi (1993), observaron que el citoplasma de óvulos congelados y descongelados llegan a ser de color claro y son de textura irregular, presumiblemente resulta de finos cambios estructurales en el citoplasma producidos por el congelamiento y descongelamiento, Otoi et. al., (1992), sugieren que la reducción en la capacidad del desarrollo en ovocitos congelados pudieran resultar grietas en la zona pelúcida, incrementando la incidencia de poliploidía, trastornos de la membrana plasmática, desorganización extensiva del ooplasma y daños a los organelos disgregados durante la congelación.

Como una sencilla célula de considerable volumen, el óvulo es probable que sea más vulnerable a desafíos osmóticos que el embrión multicelular. Primero, la deshidratación de esta gran célula demanda un extensivo transporte de agua a través de una membrana plasmática y segundo, no hay capacidad de desarrollo como se encuentra en el embrión multicelular. Cada paso de procedimiento durante la criopreservación, probablemente contribuye separado

ó acumulativamente a un bajo desarrollo del potencial del óvulo sometido al congelamiento y descongelamiento (leibo et. al.,1996).

Se especula que el desplazamiento periférico de las vesículas y mitocondrias está asociado con el incremento de deshidratación y el resultante encogimiento de los óvulos. De este modo, las vesículas que constituyen un mayor compartimento del óvulo son comprimidas durante el encogimiento y es probable que el incremento de la agrupación de vesículas sea el resultado de este efecto (Schmidt et. al., 1995). Sobre la expansión del óvulo, las vesículas aparentemente quedan concentradas en una posición cercana a la membrana plasmática, lo que provoca un desplazamiento periférico (Schmidt et. al., 1995).

Siguiendo el Seeding (Proceso físico de sembrado para la realización de la solidificación del medio), la membrana plasmática es capaz de adaptarse a los cambios en el volumen celular, durante el encogimiento adicional debido a la continuidad post-seeding del congelamiento frecuentemente causa ruptura de la membrana (leibo et. al.,1996).

Estos procesos criogénicos se han desarrollado en dos formas: una llamada congelamiento suave que consiste en un preenfriado de la célula que va de temperatura ambiente a 5°C, enfriado que va de los 5 °C a -7 °C con una velocidad de descenso de 1-3°C/min. Este sembrado es una inducción a la congelación con una duración de 5-15 minutos a esta temperatura, post sembrado que va de -7 °C a -30 °C con una velocidad de descenso de -0.1 a -0.5 °C y el último que consiste en sumergir a temperatura de -196 °C que es la temperatura de N2L. (Toner et. al., 1991). Congelamiento rápido, o también llamado vitrificación consiste en un enfriamiento rápido que va de la temperatura ambiente de 25 °C a la temperatura de inducción que es de -5.3 °C; sembrado de inducción a la congelación por 10 minutos y posteriormente, se sumerge directamente en N2L. (Toner et. al., 1991).

Una variedad de crioprotectores han sido usados y se han clasificado en dos grupos: Crioprotectores intracelulares permeables como: polietileno, propileno, etilenglicol, glicerol, ficol y DMSO, entre otros. Crioprotectores extracelular no permeables como: sacarosa, lactosa y glucosa (Douglas., 1990).

Cuando los óvulos fueron congelados y después descongelados, madurados e inseminados *in vitro* se presentaron deficiencias, pudiendo ser el resultado del daño a células del cúmulus, ya que éstas son necesarias para soportar la maduración completa o posible daño en la organización de microtúbulos que es reflejado en la primera división mitótica (Sathananthan et. al., 1988).

Jondet et. al., (1984) analizaron el volumen en óvulos de Hámster y encontraron que durante la congelación y descongelación inmediatamente después de la adición de un crioprotectante, el encogimiento de los óvulos ocurre debido al flujo de agua hacia afuera. Sobre la adaptación, el óvulo retiene parte de este volumen original, pero después del alargamiento otra deshidratación toma lugar dirigiendo a un nuevo encogimiento. Después de la descongelación el óvulo se expande hacia este volumen inicial.

Lehn , (1986) encontró que el encogimiento de los embriones es debido a una reducción de temperatura de 0 a -25°C, sin embargo, fue más pronunciado este encogimiento al inicio de la congelación -10 °C, y continuó hasta -25 °C cuando la mórula y el blastocisto alcanzaron el 45 y el 60% de encogimiento respectivamente (Sathananthan et. al., 1987).

Se probaron tres modelos de congelamiento en ovocitos de ratón, los cuales son: congelamiento suave, congelamiento rápido y vitrificación, usando como crioprotectores el 1.2 propanidol y sucrosa, se encontraron los siguientes resultados: 86.4%, 93.3% y 78.5% respectivamente, lo cual, indica que para esta especie el crioprotector usado y el sistema de congelación rápido es satisfactorio (Men, 1997).

Al congelar óvulos humanos maduros en propanidol y DMSO se observa que el principal daño es un rompimiento en la zona pelúcida, el trastorno de la membrana plasmática y la desorganización extensiva del ooplasma junto con el daño de alargamiento en alguno de los óvulos, este alargamiento de los organelos son causados por ser sensibles a la crioprotectores (Sathananthan et. al., 1988; Vicent et. al., 1989; Ruffing 1992).

Las características que presentan los óvulos al iniciar el descenso de temperatura en su etapa de equilibrio y enfriamiento hacia los 5°C. provoca un desplazamiento periférico de vesículas y mitocondrias, como también un aumento en el agrupamiento entre las vesículas adyacentes. Tales efectos de congelamiento y descongelamiento han sido previamente observados en embriones de bovino (Mohor and Trounson, 1981; Hyttel et. al., 1987). En apariencia éstas vesículas antes de la preparación citológica probablemente contienen material lipídico, constituyendo un compartimento del óvulo que es altamente vulnerable al procedimiento de congelación (Schmidt et. al., 1995).

Otros compartimentos celulares llegan a ser afectados por el congelamiento post-sembrado causando una dilatación significativa en las mitocondrias y el retículo endoplásmico liso. Esto es notable, ya que, los organelos quedan afectados por el congelamiento de embriones en bovinos, de acuerdo con Mohr y Trounson (1981) Hyttel et. al., (1987). Este hecho indica la pronunciada susceptibilidad de ovocitos comparados con los estados tardíos del desarrollo embrionario, una característica que probablemente está relacionada con la reducción del volumen celular en relación a un incremento en el número de blastómeros en la segmentación.

Los óvulos presentan una dificultad especial al ser congelados, ya que en su división meiótica se encuentran microtúbulos y microfilamentos dañados por el enfriamiento y la exposición a crioprotectantes los cuales bloquean la segmentación de éste (Blerkom 1991; Parks and Rufftry 1992; Vincet and Jhonson 1992). Se ha mencionado que la criopreservación de óvulos pudiera inducir efectos mutagénicos en embriones resultantes (Bouquet et.al.,1995).

Usando métodos controlados de congelamiento suave como los establecidos por Willmut et. al.,(1972). Los embriones equilibrados en 1-1.5 M de crioprotector, el contenido celular está concentrado por una deshidratación gradual causada por el crecimiento de hielo extracelular, lo cual permite su sobrevivencia. Cuando la muestra es congelada en nitrógeno líquido, el citoplasma de los embriones junto con la fracción extracelular concentrada pudieran cambiar a sólidos vidriosos libres de la formación de hielo por una extremada elevación de la viscosidad Kasai (1996).

En suma, los óvulos de bovinos madurados *in vitro* congelados en glicerol desarrollan una penetración normal, pero fallan a la segmentación y a la formación del blastocisto *in vitro*. Más aún, muestran daños estructurales con una evidencia especial después del sembrado. Se han encontrado pocos reportes de óvulos congelados en el estado de Vesícula Germinal (GV) (Wittinham, 1977; Heyman, 1986; Pellicer et. al., 1988). Varios investigadores han intentado congelar ovocitos en metafase II con diferente éxito (Friedler et. al., 1988).

Es necesario un mejoramiento en el método de congelación, dado que la sobrevivencia después del descongelamiento es variable y depende de la especie, el estado de desarrollo y la calidad del embrión (Kasai, 1996).

Para maximizar la práctica efectiva de tales protocolos, las técnicas pudieran ser muy útiles para almacenar por largos períodos óvulos con similares técnicas empleadas en la congelación de espermatozoides (Schroeder et. al., 1989). Mas de 190,000 embriones de bovinos han sido criopreservados y transferidos alrededor del mundo (Tribier et. al., 1995).

Mejorando los protocolos de maduración específicos de especie, finalmente pudieran permitir investigaciones para aprovechar un gran número de óvulos inmaduros contenidos en los ovarios de mamífero, lo que incrementaría la población de animales valiosos. Si los embriones pueden ser criopreservados efectivamente, la técnica puede ser aplicada a una basta

variedad de especies de mamíferos, animales domésticos, animales de laboratorio, animales silvestres y en la especie humana.

D) FISIOLÓGÍA DEL DESARROLLO FOLICULAR DEL BOVINO

Durante el desarrollo fetal, las oogonias se producen por multiplicación mitótica, posteriormente aparece el primer folículo antral en la vida fetal tardía y logra un máximo número alrededor de dos meses de edad. El número de folículos primordiales son alrededor de 150,000 por par de ovarios en el nacimiento, declinando suavemente con la edad entre 4 a 6 años y declina más rápidamente llegando a 0 a la edad de 20 años.

Al nacimiento, una capa de células foliculares rodea al ovocito primario en el ovario y en ella se forman los folículos primordiales, al principio estos se encuentran diseminados por todo el ovario, pero durante la vida neonatal temprana se van disponiendo solo en la zona cortical, bajo la túnica albugínea rodeando la medula vascular, así a lo largo de la vida reproductiva la vaca cuenta con folículos preovulatorios y antrales con una baja proporción del número total de folículos en un ovario (Hafez, 1985).

El ovocito primario se encuentra reprimido en el estado de dictiotene (profase de la primera división meiótica) antes del nacimiento, cada día una pequeña población de folículos primordiales sufre una serie de cambios que es representado por su desarrollo folicular, estos cambios incluyen proliferación y crecimiento de las células foliculares para formar múltiples capas alrededor del ovocito y el crecimiento del mismo. (Alberts et. al., 1989). Conforme los folículos continúan su crecimiento, se desarrolla una cavidad que se va llenando de líquido folicular, esto es, conocido como folículo antral, pero el desarrollo de folículos antrales para folículos ovulatorios dependen de la presencia de gonadotropinas y esteroides. El crecimiento folicular y la maduración en el ovario representan una serie de transformaciones subcelulares y moleculares. En el crecimiento folicular intervienen proliferación y

diferenciación inducidas por hormonas de células de la teca y de la granulosa, al final aumentan su capacidad de producir estradiol y responder a las gonadotropinas hipofisiarias. La producción de estradiol determina que folículo estimula los receptores de LH necesarios para la ovulación y luteinización. El ovocito está altamente especializado para un desarrollo independiente con grandes reservas de nutrientes, su citoplasma contiene reservas nutricionales en forma de yema, el cual, es rico en lípidos y proteínas (Gilbert, 1994).

El crecimiento del Ovocito se da a través de diversos mecanismos especiales: Los ovocitos toman de la yema las proteínas a partir del fluido extracelular mediante un receptor mediador de endocitosis. Hay dos tipos de células que actúan en esta vía de ovogénesis: Las células que lo rodean llamadas enfermeras, son usualmente conectadas por un puente citoplasmático a través de las cuales pueden pasar directamente dentro del citoplasma del ovocito. Otras células accesorias en el ovario que ayudan a nutrir a los ovocitos son las células foliculares, dispuestas como en capa epitelial alrededor del ovocito y conectadas por una unión en forma de garganta, permiten el cambio de pequeñas moléculas pero no macromoléculas (Gilbert, 1994).

Las células accesorias circundantes hacen una contribución adicional al desarrollo del ovocito, ésta es la célula accesoria que responde a las hormonas polipeptidas llamadas gonadotropinas, estas liberan el ovocito a partir de la profase I que facilita la maduración. Los cambios más dramáticos que ocurre en los folículos de Graff en mamíferos justo antes de la ovulación es la expansión o mucificación de las células del cúmulus (Hafez, 1985).

El tiempo requerido para que un folículo de bovino crezca del primer estado antral (cerca de 0.13 mm), al tamaño preovulatorio, es cerca de 42 días o dos ciclos estruales. El inicio del ciclo ovulatorio regular en la vaquilla es incompleto al término del ciclo sin ovulación, en la pubertad los ovarios alcanzan la capacidad para ovular mas constantemente en respuesta al pico de LH y regulan el ciclo estrual estabilizándolo (Hafez, 1985).

Evidencias recientes indican que de 2 a 3 oleadas de crecimiento folicular ocurren durante el ciclo estrual del bovino, con la oleada final se producen folículos ovulatorios con probabilidad de ser diferenciados de los folículos antrales de bajo crecimiento, alrededor de 48 horas anterior a la ovulación (Hafez,1985).

E) MADURACIÓN DE OVOCITOS *IN VITRO*

Los ovarios de animales domésticos, recuperados en rastro, podrían proveer suficiente material gonadal dirigido hacia la producción de embriones para ser manipulados y transferidos si los ovocitos pudieran ser madurados, fertilizados y cultivados *in vitro*, además de ser criopreservados. Muchas investigaciones han comprobado la viabilidad de esta técnica (Otoi, 1997).

La maduración del óvulo fue definida como la asociación de eventos, que inician con una vesícula germinal (GVBD) y el cumplimiento de la primera división meiótica, refiriéndose así a la maduración nuclear.

En la vaca la ovulación ocurre aproximadamente 30 horas después de comenzar la oleada de LH, durante este tiempo los ovocitos que se encuentran en meiosis y progresan hasta el estado de metafase de la segunda división meiótica. En algunos mamíferos la fertilización induce la reiniciación de la maduración nuclear para completar la meiosis II del ovocito secundario bovino.

En general, se consideran tres tipos de maduración: citoplásmico, nuclear y de maduración externa (expansión de la masa de células del cúmulus que circundan al ovocito) (gondolfi, 1997).

El proceso de maduración es un paso muy importante para una subsecuente penetración de la célula espermática dentro del ovocito y su desarrollo, el encuentro del ovocito con el espermatozoide en el espacio perivitelino se da una hora después de la inseminación, incrementándose con la maduración nuclear del ovocito avanzando a Metafase I - Telofase I, estos cambios aparecen cuando se da la penetración de la célula espermática dentro

del ovocito el cual se encuentra en etapas de transición o cercanas a metafase II. Esta capacidad de ser fertilizado es adquirida justo antes o en el tiempo de la segunda división meiótica (Hafez,1985).

First and Parrish, (1987) consideran que la maduración del ovocito puede ser el progreso de la maduración nuclear, como incluye la aparición de vesícula germinal (GV) del estado de arresto en dictiotene siguiendo de meiosis I a metafase II y la expulsión del primer cuerpo polar (Kastrop et. al., 1990), también mencionan que los cambios específicos en la síntesis y fosforilación de proteínas, fueron programados en el proceso de maduración del ovocito de bovino anterior al estado de vesícula germinal.

En primates, rumiantes y otros mamíferos las células del cúmulus de folículos graffianos en crecimiento son indistinguibles de las células de la granulosa. Después de oleadas cíclicas de gonadotropinas aparecen cavidades dentro de la masa celular, siendo estas células del cúmulus las que circundan al ovocito y forman la corona radiada. Estas investmentas del ovocito y la apariencia del citoplasma ha sido el mejor indicador del potencial de desarrollo del ovocito para su maduración espontanea. En general, las células del cúmulus están compuestas por células foliculares, de la teca y de la granulosa, durante el período de maduración de ovocitos *in vitro* benefician los procesos produciendo piruvato como proveedor del sustrato de energía (Gilbert, 1994).

Varios medios de maduración tienden a ser usados como, el TCM-199 y Ham-F10, la maduración *in vitro* viene ha ser un proceso próspero especialmente donde es mejorado por la adición de hormonas. Los esteroides juegan un papel importante en la maduración de ovocitos porque al estar presentes toman e incorporan proteínas (Pontbriand,1989).

Las células foliculares tienden ha ser usadas en cocultivo de CCO (complejo del cúmulus ovocito), estas células son divididas en 3 categorías: corona radiada, células del cúmulus y células de la granulosa. La corona radiada es una capa sencilla de células columnares inmediatamente circundando a la zona pelúcida. Se cree que las células del cúmulus juegan un papel importante en la

maduración del propio ovocito, ya que proporcionan el factor de desarrollo para éste, al igual, dichas células tienen una comunicación directa con el ovocito a través de microtúbulos que están conectados de las células del cúmulo con la zona pelúcida y se dirigen al ooplasma (First and Parrish, 1987).

La técnica de maduración y fertilización *in vitro* provee el material necesario para los experimentos en ingeniería genética con el fin de corregir defectos genéticos además de otras aplicaciones útiles proporcionando embriones sincronizados en un estado específico de desarrollo. Con la producción de un número grande de embriones, esta técnica de investigación puede ser aplicada a clonación, sexado de embriones, procesos de congelamiento y a la vez para la determinación de las variadas fases fisiológicas involucradas en el ciclo celular, en el control de la meiosis, maduración folicular, singamia, desarrollo embriológico temprano y la interacción con el tejido *in vitro*.

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las ventajas potenciales de bancos de gametos en mamíferos son grandes, lo que permite almacenar germoplasma de individuos con un material genético de alto valor económico, así como también de especies silvestres. Sin embargo, las técnicas de criopreservación actuales sólo permiten un bajo índice en el desarrollo de óvulos cuando son sometidos al congelamiento suave; por lo que la técnica de vitrificación se ha probado en ratones y ha demostrado un aumento en la viabilidad de óvulos. Sin embargo, esta técnica no se ha utilizado en óvulos de bovino en estado de vesícula germinal, lo que podría ofrecer un incremento importante en el índice de sobrevivencia, lo que permitirá contar con material germoplasmico para diversas aplicaciones biotecnológicas por muchos años.

III.- HIPÓTESIS

La modificación de curvas de descenso de temperatura y congelamiento de óvulos en estado de vesícula germinal y de metafase II, elevará el índice de viabilidad de óvulos de bovino sujetos a criopreservación por vitrificación.

IV.- OBJETIVOS:

GENERAL : APLICACIÓN DE LA TECNICA DE VITRIFICACION A OVULOS DE BOVINO EN ESTADO DE VESICULA GERMINAL Y METAFASE II.

ESPECIFICOS:

- 1.- Lograr la vitrificación de óvulos en estado de Vesícula Germinal (V.G.), así como su maduración *in vitro*.
- 2.- Lograr la maduración *in vitro* y la vitrificación de óvulos (Estado de metafase-II).
- 3.- Realizar un estudio comparativo cuando los óvulos son vitrificados en estado de Vesícula Germinal y Metafase II.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

V.- MATERIAL Y METODOS

El trabajo experimental se realizó en las instalaciones del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara

Los protocolos desarrollados son:

Maduración de óvulos *in vitro* de bovino.

Criopreservación de óvulos por congelamiento rápido (vitrificación).

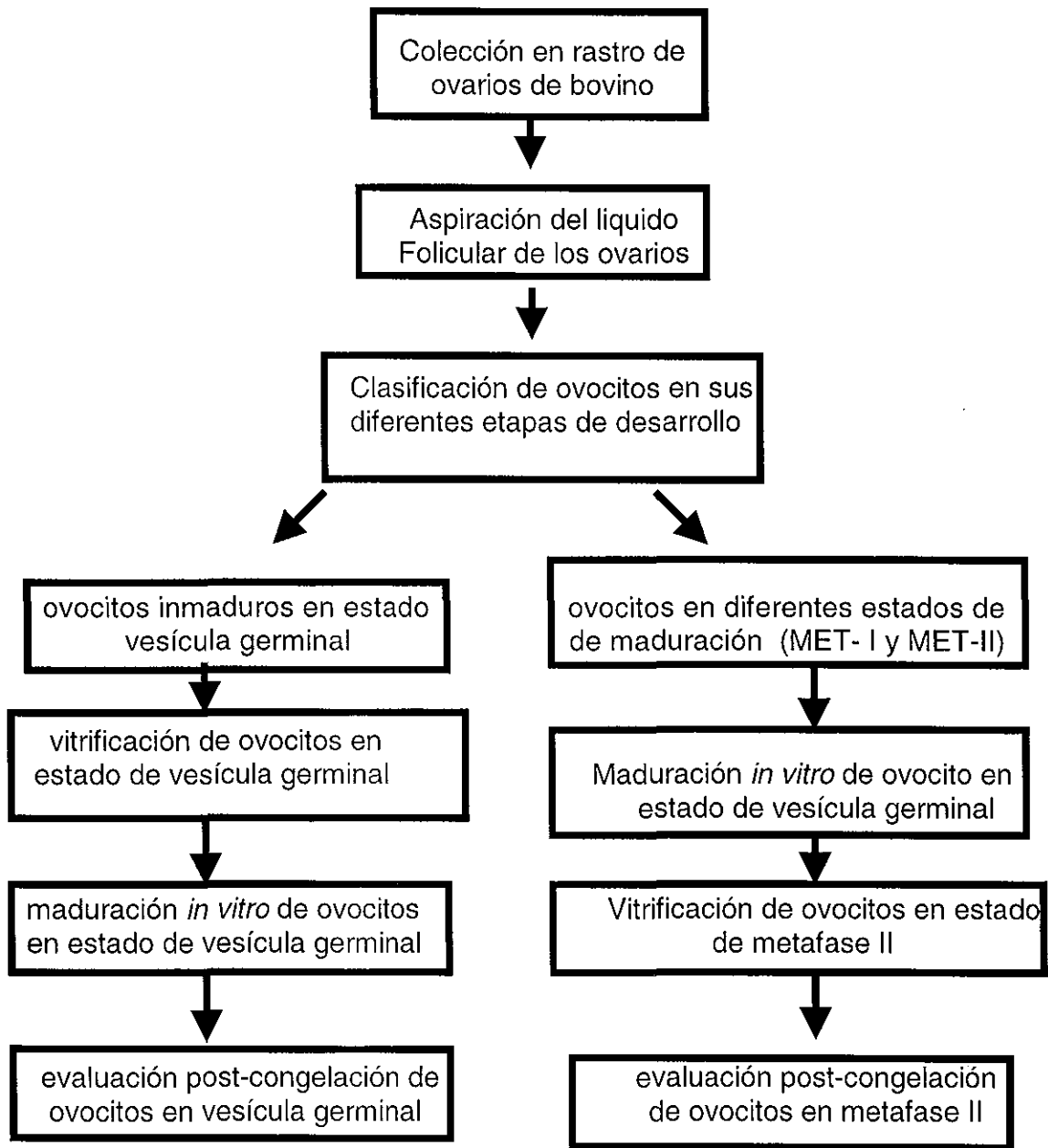
METODOLOGIA

El soporte de material biológico (ovarios) fue suministrado por el rastro municipal de Guadalajara, que se encuentra localizado, aproximadamente, a 30 Km. del laboratorio de morfofisiología. Para este trabajo se utilizaron ovarios procedentes de vacas de diferentes razas, de los cuales predominó la cruce con cebú. El material incluyó ovarios tanto de vacas como de vaquillas.

Los procedimientos que se llevaron a cabo para la técnica fueron bajo el seguimiento de protocolos establecidos por Ledezma, (1991) y modificados por Roa, V. (1992). Los protocolos que se trabajaron fueron: A) Colección de ovarios, B) Colección y Clasificación del complejo cúmulus ovocito, C) Maduración de ovocitos *in vitro*, F) Evaluación de ovocitos madurados *in vitro*, G) Vitrificación de ovocitos, H) Evaluación de ovocitos congelados.

Se realizaron tres ensayos con espacio de 30 días entre cada uno. Se trabajaron para aspiración y maduración 15,17, y 19 ovarios respectivamente.

Figura 11.- Diagrama de flujo de la metodología para maduración y vitrificación de Ovocitos de bovino *in vitro*.



A) METODOLOGÍA PARA LA COLECCIÓN DE OVARIOS

A.1 MATERIALES REQUERIDOS PARA LA COLECCIÓN EN EL RASTRO

- Termo para transporte de solución y ovarios.
- Overol, bata, botas de hule.
- Equipo de disección estéril.
- Papel y guantes estériles.
- Termómetro de -20 a 100 °C.
- Bolsas de polietileno estériles.
- Solución salina fisiológica de transporte.

A.2 PREPARACIÓN PARA LA COLECCIÓN DE OVARIOS

Se prepararon 5 litros de solución salina fisiológica al 0.9% de NaCl y se esterilizó en el autoclave.

El día de la colección se agregaron 100,000 UI de penicilina y 100 mg. de estreptomicina por litro de solución salina, se elevó la temperatura a 39 °C procediendo a la colección de ovarios en el rastro.

A.3 Colección de ovarios

Se colectaron los ovarios inmediatamente después del sacrificio de los animales directamente de las canales. Se removió todo el exceso de tejido, después se lavaron con solución salina fisiológica varias veces a 38 °, después se colocaron en un termo donde fueron transportados al laboratorio dentro de las 2 o 3 horas posteriores a la colección. Se retiró la grasa y todos los tejidos no ováricos, se introdujeron en el termo con la solución fisiológica, se trasladó al laboratorio dentro de las dos a tres horas posteriores a la colección.

B) COLECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL COMPLEJO CUMULUS OVOCITO

B.1 Preparación del laboratorio

Se limpiaron las barras y el piso con solución antiséptica orgánica.

Se prepararon jeringas de 5 ml. y agujas del N° 18 y 20. estériles. También se esterilizaron gasas, guantes, papel, cubrebocas y la solución salina fisiológica.

Se prepararon vasos de precipitado de 50 ml, cajas de petri de 90 mm, pipetas Pasteur modificadas, baño María a 38 °C y el microscopio estereoscópico.

B.2 Procedimientos para la aspiración del Complejo Cúmulus Ovocito (CCO).

Una vez que los ovarios se recibieron en el laboratorio, se lavaron tres veces con solución salina fisiológica a 37 °C. Posteriormente se colocaron en baño María con la misma solución y a la misma temperatura.

Antes de la aspiración los ovarios se secaron con toallas de papel estériles. Hecho este procedimiento se tomó con la jeringa de 5 ml, aproximadamente, 1 ml. de medio talp-hepes antes de proceder a aspirar los folículos. Los folículos que se aspiraron fueron los que midieron de 2 a 6 mm de diámetro. Una vez aspirados se depositaron suavemente junto con el medio en las cajas de petri para su posterior búsqueda y clasificación del CCO. Este último se realizó a través del microscopio estereoscópico.

Búsqueda de ovocitos.

- 1.- Se cuadriculó la base de una caja de petri grande (90 mm), se depositó el líquido folicular aspirado en las placas para buscar los ovocitos.
- 2.- Las observaciones se hicieron a 3 de los niveles de profundidad.
- 3.- Se extrajo de la incubadora una caja con M-PBS y el medio de maduración.
- 4.- Se aspiraron los ovocitos con una pipeta modificada en su extremo de tamaño, aproximado, de 160 μ de diámetro. Comprobando el borde externo de la pipeta con el microscopio, evitando así dañar al ovocito.
- 5.- Se lavaron los ovocitos aspirados en M-PBS.

Tabla N°1 Clasificación de ovocitos inmaduros.

Para la clasificación de los ovocitos se utilizó un microscopio estereoscópico de 40 aumentos. Los criterios para la clasificación de los ovocitos fueron los siguientes:

CLASIFICACION	CARACTERISTICAS
A	Ovocitos rodeados con tres o mas capas de células de cúmulus compacta.
B	Ovocitos rodeados por una monocapa de células del cúmulus.
C	Ovocitos parcial o totalmente desnudos.
D	Ovocitos rotos, deformes o rodeados de fibrina.

Las categorías C y D se descartaron para el proceso de maduración *in vitro*, ya que es muy difícil alcanzar los niveles óptimos requeridos para la maduración.

C) COLECCIÓN DE OVOCITOS *IN VITRO*

El día de la aspiración se preparó y esterilizó el medio para la maduración de los ovocitos (TCM-199), por medio de filtración con microporo de 45 micras. Posteriormente, se colocaron en cajas de petri, de 35 milímetros, gotas de éste medio (100 μ l). Antes de colocar los ovocitos en este medio, se equilibró por espacio de dos horas en la estufa con 5 % de CO₂, y a 38 °C. El mismo procedimiento se realizó para el medio TALP-HEPES.

Se preparó una pipeta Pasteur modificada, que consiste en ajustar el diámetro de dicha pipeta y los bordes de la misma al tamaño del ovocito con las células del cúmulus, con el fin de que al momento de la aspiración no se dañen.

Antes de transferir los ovocitos al medio de maduración, se lavaron de dos a tres veces con el medio TALP-HEPES, hecho lo anterior se transfirieron todos los ovocitos clasificados con las categorías de A y B. Esta transferencia se llevó a cabo a las gotas de medio de maduración TCM-199, las cuales después se cubrieron con aceite mineral con el objeto de evitar la evaporación del medio.

Se colocaron 20 ovocitos en cada gota de medio de maduración, posteriormente, se colocaron en la estufa con 5 % de CO₂, 38 °C y con 90 % de humedad. Este proceso de maduración alcanzó una duración de 24 horas.

D) EVALUACIÓN DE OVOCITOS.

- Ovocitos que permanecen en estado de vesícula germinal.

Estos ovocitos no iniciaron la maduración, manteniéndose en el mismo estado en que se obtuvieron. Estos ovocitos se caracterizan por tener un vitelo que ocupa casi todo el espacio determinado por la zona pelúcida, de tal modo que la membrana plasmática parece estar en estrecha proximidad. Su núcleo es prominente y vesicular. Se considera que en el ovocito no se cumplió la división meiótica (dictiotene).

- Ovocitos que no completaron la maduración hasta metafase II.

Están incluidos los que reiniciaron la meiosis pero que no llegaron a completar la metafase II. Se caracterizan por la ausencia de vesícula germinal así como el primer cuerpo polar, además se observó una muy leve contracción del vitelo. Se consideran también a los que se encuentran en estadios intermedios de la meiosis.

- Ovocitos que completaron la maduración hasta metafase II.

Se incluyen a los ovocitos que presentan expulsión del primer cuerpo polar cuya presencia indica que proseguirá su maduración hasta metafase II de la meiosis.

E) CRIOPRESERVACIÓN DE OVULOS

1. LA VITRIFICACIÓN DE ÓVULOS SE REALIZÓ SIGUIENDO LOS SIGUIENTES PROCEDIMIENTOS:

- Equilibrio con el Crioprotector
- Enfriamiento e inducción de la congelación (sembrado)
- Inmersión en N, L
(Almacenamiento en N, L)
- Descongelación
- Dilución del Crioprotector
- Estimación de la Viabilidad

2. CRIOPROTECTORES Y PROCEDIMIENTOS DE ENFRIAMIENTO

A) Crioprotectores

Las sustancias que fueron utilizadas como crioprotectores para la criopreservación de óvulos bovinos son:

- A) Intracelular (permeable) **glicerol**
- B) Extracelular (no permeables) **sacarosa**

Antes de la congelación, los óvulos se equilibraron con el crioprotector. La adición del crioprotector fue realizada transfiriendo los óvulos en 3 etapas a diferentes concentraciones del crioprotector (de menor a mayor concentración). Se equilibraron por 15 minutos a temperatura ambiente.

Enfriamiento y congelación

Para este paso se utilizó un equipo de congelación, que consta de embolo de metal compuesto por diferentes durezas de acero inoxidable, con una oradación en forma vertical donde son depositadas las pajillas y una segunda oradación que se presenta en forma continua partiendo de la base hasta el termino del eje, también utilizado como mango, El termómetro utilizado ha sido adaptado al anterior émbolo descrito en una oradación para pajillas, este termómetro es digital de rango de los 50 °C a – 50 °C.

La forma de controlar la velocidad del descenso es como sigue: Se cuenta con un termo de nitrógeno líquido de boca corta, lo que permite ajustar el émbolo de congelación a la boca de éste, la frecuencia de cambio en la profundidad que se le aplique al émbolo sobre la boca del termo será la temperatura que se obtenga.

Previamente se estandarizó esta técnica para encontrar la frecuencia de cambios de posición y tiempo de estabilización para congelar los ovocitos por medio de este sistema.

Para la estabilización de 5 °C se utilizó un refrigerador convencional, donde previamente se ajusto a esta temperatura.

Los óvulos fueron enfriados a una tasa de descenso de 1° a 3 °C/min, desde la temperatura ambiente hasta la temperatura de inducción de la congelación. La inducción de la congelación (sembrado) se realizó a -7° C, (se realizó por medio de pinzas enfriadas en N2L).

Después de la inducción a la congelación la temperatura se mantuvo por 10 min. Luego los óvulos fueron sumergidos en nitrógeno líquido a –196 °C.

3. OBSERVACIONES SOBRE EL PROCESO DE CONGELACIÓN

A) Estado de desarrollo de los óvulos

Los óvulos se clasificaron en dos grupos; en estado de vesícula germinal y en Metafase II para óvulos madurados in vitro.

B) Calidad de los óvulos

Los óvulos de poca calidad no se congelaron, siendo la uniformidad de sus estructuras y sus características las que incidieron en esta evaluación.

C) Tiempo empleado hasta la congelación

Después de recolectar y evaluar los óvulos fueron congelados, (ya que el permanecer en el medio de almacenamiento durante mucho tiempo les disminuyen su vitalidad después de la descongelación).

El tiempo establecido para el equilibrio y la dilución fue uniformado

(largos periodos en la solución crioprotectora o en la solución de sacarosa tienen efectos perjudiciales sobre los óvulos).

MÉTODO DE CONGELACIÓN

I) Medio de Congelación (Solución Crioprotectora)

10 % Glicerol in M-PBS + 20 % Suero fetal bovino

M-PBS + 20 % C.S. 9 ml (sacarosa 0.25 M)

Glicerol 1 ml

Como el glicerol es un liquido viscoso, la parte pegada a la punta de la pipeta se limpió y el interior de la pipeta se lavo aspirando y expeliendo el medio varias veces.

Una vez que el glicerol estuvo perfectamente disuelto, se esterilizó utilizando un filtro de 0.22 micras.

El método de preparación es mostrado en el anexo No. I

2) Equilibrio

El proceso se realizó iniciando a temperatura ambiente. Temperaturas demasiado bajas hacen que el ingreso del glicerol en el óvulo se retrase. Se prefirió una temperatura de alrededor de 25 °C.

(Equilibrio Por etapas)

Se Preparó 3.3, 6.7 y 10 % de Glicerol en placas de petri de 30 mm. Se transfirieron los óvulos previamente lavados en medio de almacenamiento (M-PBS + 20% C.S.) a las soluciones de 3.3, 6.7 y 10 % de Glicerol con intervalos de 10 minutos entre cada una.

Los óvulos fueron transferidos con la menor cantidad del medio posible por 10 minutos. Una vez que fueron transferidos a la concentración final de 10% de Glicerol, se cambiaron una vez más a una solución nueva de 10% de Glicerol y luego se cargaron en la pajilla de 0.25 ml para iniciar la congelación.

3) Preparación de la pajilla

- Antes de utilizarlas, las pajillas fueron lavadas con agua pura, evitando no mojar el tope de algodón, se secaron y esterilizaron con rayos ultravioleta.
(Cargado del óvulo en la pajilla)
- Para aspirar los óvulos se adaptó una jeringa de tuberculina a la pajilla
(sellado de la pajilla)
- Después de cargado el óvulo, la pajilla se sello mediante pinzas calentadas en el fuego.

4) Enfriamiento y Congelación

Tabla N° 2 Programa de Congelación

Fase	Tasa de Enfriamiento
Temperatura ambiente (25 °C)	1-2 C/min. o directamente a la temperatura de inducción a la congelación.
Inducción de la congelación -5.3 °C	Mantenerse a -7 °C por 10 min. *2 a 3 min. Después de llegar a -7 °C se realizó la inducción de la congelación (sembrado)
Sumergir en N2L	Temperatura de inmersión en N2L de -196 °C

5) Descongelación

Las pajillas fueron descongeladas en agua a 37 °C. Antes de ponerlas en el agua se mantuvieron en el aire por 10 segundos para prevenir daños a la zona pelúcida.

6) Dilución del Crioprotector (Por etapas)

- Se preparo 6.7 y 3.3 % de Glicerol, y M-PBS + 20 % C.S (solución de almacenamiento) en placas pequeñas.
- El contenido de la pajilla descongelada se vació en una placa pequeña. Luego el óvulo fue aspirado y transferido a 6.7 y 3.3 % de Glicerol y finalmente a M-PBS + 20 % suero fetal bovino, consecutivamente a intervalos de 5 minutos.

Por etapas:

- A) 10% de glicerol
- B) 6.7% de glicerol durante 5 minutos
- C) 3.3 % de glicerol durante 5 minutos
- D) medio- PBS durante 10 minutos

(Adición de sacarosa)

Se preparó 0.3 M de solución de sacarosa en M-PBS + 20 % suero fetal bovino. (El método de preparación se muestra en el anexo I)

Después el óvulo fue transferido directamente a la solución de sacarosa a 37 °C. en una placa pequeña.

- Después de 10 min. en la solución de sacarosa el óvulo se transfirió a M-PBS + 20 % C.S.

Después de estas diluciones los óvulos se lavaron varias veces en M-PBS

EVALUACION

- Evaluación antes y después de la vitrificación: los óvulos en estado de vesícula germinal (VG) fueron evaluados por sus integridad de sus investmentas, así como la uniformidad de sus organelos.
- Evaluación de óvulos madurados *in vitro* después de someterlos a vitrificación.
- Evaluación de óvulos vitrificados después de madurarlos *in vitro*.

VI.- RESULTADOS

Los resultados de la colección y la eficiencia en la aspiración de ovocitos por ovario se presentan en el tabla 3. De los tres ensayos realizados, en el primero se utilizaron 15 ovarios, a partir de estos se colectaron por aspiración 134 ovocitos, observándose una eficiencia de 8.9 ovocitos por ovario, en el segundo ensayo se utilizaron 17 ovarios de los cuales se obtuvieron 142 ovocitos, con una eficiencia en la aspiración de 8.3 ovocitos por ovario y en el tercero donde se utilizaron 19 ovarios, se aspiraron 167 ovocitos mostrando una eficiencia de 8.7 ovocitos por ovario. Para esta variable se utilizaron un total de 51 ovarios mediante los cuales se obtuvieron 443 ovocitos, promediando una eficiencia en la aspiración para los 3 ensayos de 8.6 ovocitos por ovario.

En la eficiencia de la aspiración entre los tres ensayos, no se encontraron diferencias donde los valores fluctuaron entre 8.3 y 8.9 ovocitos por ovario.

TABLA N° 3 Colección de ovarios y ovocitos

ENSAYOS	OVARIOS	OVOCITOS ASPIRADOS
1	15	134/8.9%
2	17	142/8.3%
3	19	167/8.7%
TOTAL	51	443/8.6%

La distribución de los porcentajes en las categorías de clasificación de ovocitos en los tres ensayos analizados en este estudio se presentan en la Tabla 4. En el primero se utilizaron 134 ovocitos, para ser clasificados. Se observó que para las clases A, B, y C, D, correspondieron los valores de 69.5% y 30.5% respectivamente. Para el segundo ensayo, 142 ovocitos fueron utilizados clasificándose de la siguiente manera: 58.5% y 41.5 % respectivamente y por último en el tercero, se utilizaron 167 ovocitos, los cuales, también de acuerdo con el criterio de clasificación mostraron los siguientes valores: 67.6% y 32.4 % respectivamente. Cuando se analizó estadísticamente no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los 3 ensayos.

Sin embargo cuando el análisis estadístico se aplicó a las variables de grupo A y B comparados con los del grupo C y D se observó una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$)**

TABLA N° 4 CLASIFICACIÓN DE OVULOS ASPIRADOS

OBSERVADOS

ENSAYOS	OVOCITOS EN CLASE A Y B	OVOCITOS EN CLASE C Y D	OVOCITOS ASPIRADOS
1	93/69.5%	41/30.5%	134
2	83/58.5%	59/41.5%	142
3	113/67.6%	54/32.4%	167
TOTAL	289/65%	154/34.7%	443

ESPERADOS

ENSAYOS	OVOCITOS EN CLASE A Y B	OVOCITOS EN CLASE C Y D	TOTALES
1	87.41	46.58	134
2	92.63	49.36	142
3	108.94	58.05	167
TOTAL	289	154	443

$$\chi^2 = 4.3422 \quad \chi^2_{2g} \ 0.05 = 5.99 \ (p > 0.05)$$

$$H_0 : P_1 = P_2$$

$$H_1 : P_1 \neq P_2$$

ESPERADO

ENSAYOS	OVOCITOS EN CLASE A Y B	OVOCITOS EN CLASE C Y D	TOTALES
1	67	67	134
2	71	71	142
3	83.5	83.5	167
TOTAL	221.5	221.5	443

$$\chi^2 = 45.078^{**} \quad \chi^2_{2g} \ 0.05 = 5.99$$

$$(p < 0.01) \quad \chi^2_{2g} \ 0.01 = 9.21$$

El efecto de la vitrificación sobre la sobrevivencia de ovocitos se muestra en el tabla 5.

Un total de 143 ovocitos se vitrificaron en la etapa de vesícula germinal, repartidos en tres ensayos como sigue, 46, 41 y 56 ovocitos respectivamente. Así mismo se descongelaron y se evaluaron obteniendo los siguientes datos.

Los resultados en la sobrevivencia de ovocitos fueron 28/60.8%, 22/53.6% y 36/62% para los tres ensayos respectivamente, así mismo los ovocitos que no sobrevivieron a la vitrificación fueron 18/39.2%, 19/46.4% y 20/35.8% respectivamente.

Cuando se analizó estadísticamente no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los 3 ensayos. Así mismo cuando se compararon los resultados de ovocitos que sobrevivieron con los que no sobrevivieron se encontró estadísticamente una diferencia significativa ($p < 0.05$), pero no significativa cuando la probabilidad aumentó ($p > 0.01$).

TABLA Nº 5 EVALUACIÓN DE OVULOS VITRIFICADOS EN VESÍCULA GERMINAL.

OBSERVADO

ENSAYO	SOBREVIVIERON	NO SOBREVIVIERON	VITRIFICADOS
1	28/60.8%	18/39.2%	46
2	22/53.6%	19/46.4%	41
3	36/62%	20/35.8%	56
TOTALES	86/60.1%	57/39.8%	143

ESPERADO

ENSAYO	SOBREVIVIERON	NO SOBREVIVIERON	TOTALES
1	27.66	18.33	46
2	24.65	16.34	41
3	33.67	22.32	56
TOTALES	86	57	143

$$X^2 = 1.1301 \quad X^2_{2g} \ 0.05 = 5.99$$

$$p > (0.05)$$

$$H_0 : P_1 = P_2$$

$$H_1 : P_1 \neq P_2 \quad \text{ESPERADO}$$

ENSAYO	SOBREVIVIERON	NO SOBREVIVIERON	TOTALES
1	23	23	46
2	20.5	20.5	41
3	28	28	56
TOTALES	71.5	71.5	143

$$X^2 = 6.9646^* \quad X^2_{2g} \ 0.05 = 5.99 \quad (p > 0.05)$$

$$X^2_{2g} \ 0.01 = 9.21 \quad (p < 0.01)$$

El efecto de la maduración de ovocitos in vitro es mostrado en la tabla 6. Esta se llevo a cabo en el medio TCM- 199 mas 10% de suero fetal bovino (SFB), con una suplementación de gonadotropinas, por 24 horas. Al término de la maduración se clasificaron de la siguiente manera; VG, M-I y M-II. 28, 22 y 36 ovocitos se sometieron a los procesos de maduración en tres ensayos respectivamente. Los resultados que se encontraron fueron los siguientes. Ovocitos que no iniciaron la maduración VG y aquellos que iniciaron pero no completaron la maduración MET-I Fueron 9/32.1%, 6/27.8% y 7/19.5% respectivamente para los tres ensayos.

Para los ovocitos que maduraron hasta MET-II los resultados fueron 19/67.8%, 16/72.7% y 29/80.5% respectivamente para los tres ensayos. Así mismo cuando se analizó estadísticamente las comparaciones entre los tres ensayos no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$)

Cuando se compararon los resultados de los ovocitos que llegaron a termino de su maduración MET-II con aquellos que no la completaron VG, MET-I, estadísticamente se encontró una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$)**.

TABLA N° 6 EVALUACIÓN DE OVULOS MADURADOS IN VITRO (VITRIFICADOS)
OBSERVADOS

ENSAYO	NÓ MADURARON VG y M I	MADURADOS HASTA MET-II	OVOCITOS QUE INICIARON
1	9/32.2%	19/67.8%	28
2	6/27.8%	16/72.7%	22
3	7/19.5%	29/80.5%	36
TOTALES	22	64	86

ESPERADO

ENSAYO	NO MADURARON VG y M I	MADURADOS HASTA MET-II	TOTALES
1	7.16	20.83	28
2	5.62	16.37	22
3	9.2	26.7	36
TOTALES	22	64	86

$X^2 = 2.1855$ $X^2 2g 0.05 = 5.99$

($P > 0.05$)

$H_0 : P_1 = P_2$

$H_1 : P_1 \neq P_2$ ESPERADO

ENSAYO	NO MADURARON VG y M I	MADURADOS HASTA MET-II	TOTALES
1	14	14	28
2	11	11	22
3	18	18	36
TOTALES	43	43	86

$X^2 = 21.5612^{**}$ $X^2 2g 0.05 = 5.99$ ($P > 0.05$)

$X^2 2g 0.01 = 9.21$ ($P < 0.01$)

En la tabla N° 7 se muestran los resultados obtenidos de ovocitos que se sometieron a maduración in vitro en estado de VG siendo 47, 42 y 57 respectivamente en los tres ensayos. Ovocitos que no maduraron (VG) o que iniciaron solo hasta la etapa de MET-I fueron: 8/17%, 6/14% y 7/12% respectivamente. Así mismo para los ovocitos que alcanzaron la madurez hasta la etapa de metafase II fueron; 39/83%, 36/86% y 50/88% respectivamente. Así mismo cuando se analizó estadísticamente las comparaciones entre los tres ensayos no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin Embargo cuando se comparo los ovocitos que maduraron con aquellos que iniciaron pero que no llegaron hasta MET-II así como aquellos que se quedaron en el estado de VG se encontró altas diferencias significativas ($p < 0.01$)**.

Tabla N° 7 EVALUACIÓN DE OVULOS MADURADOS IN VITRO

OBSERVADO

ENSAYO	MADURADOS EN MET-II	NO MADURARON VG Y MET-I	OVOCITOS INICIARON
1	39/83%	8/17%	47
2	36/86%	6/14%	42
3	50/88%	7/12%	57
TOTALES	125	21	146

ESPERADO

ENSAYO	MADURADOS	NO MADURARON	OVOCITOS
1	40.23	6.76	47
2	35.95	6.04	42
3	48.80	8.19	57
TOTALES	125	21	146

$X^2 = 0.4674$ $X^2_{2g} 0.05 = 5.99$
 (P>0.05)

H₀ : P₁ = P₂

H_i : P₁ ≠ P₂ ESPERADO

ENSAYO	MADURADOS	NO MADURARON	OVOCITOS
1	23.5	23.5	47
2	21	21	42
3	28.5	28.5	57
TOTALES	73	73	146

$X^2 = 74.3136$ ** $X^2_{2g} 0.05 = 5.99$ (p>0.05)
 $X^2_{2g} 0.01 = 9.21$ (p<0.01)

El efecto de la vitrificación sobre la sobrevivencia de ovocitos se muestra en el tabla 8. Un total de 125 ovocitos se vitrificaron en la etapa de metafase II, repartidos en tres ensayos como sigue, 39, 36 y 50 ovocitos respectivamente. Así mismo se descongelaron y se evaluaron obteniendo los siguientes datos.

Los resultados en la sobrevivencia de ovocitos fueron 30/77%, 27/75% y 39/78% para los tres ensayos respectivamente, así mismo los ovocitos que no sobrevivieron a la vitrificación fueron 9/23%, 9/25% y 11/22% respectivamente. Cuando se analizó estadísticamente no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los 3 ensayos. Sin embargo la sobrevivencia de ovocitos después de ser madurados *in vitro* se vio afectada cuando se compararon los resultados con aquellos que no sobrevivieron encontrándose estadísticamente una alta diferencia significativa entre estos dos grupos ($p < 0.01$)**.

TABLA N° 8 SOBREVIVENCIA DE OVULOS VITRIFICADOS EN METAFASE-II

OBSERVADO

ENSAYO	SOBREVIVIERON	NO SOBREVIVIERON	OVOCITOS VITRIFICADOS
1	30/77%	9/23%	39
2	27/75%	9/25%	36
3	39/78%	11/22%	50
TOTALES	96	29	125

ESPERADO

ENSAYO	SOBREVIVIERON	NO SOBREVIVIERON	TOTALES
1	29.95	9.04	39
2	27.65	8.35	36
3	38.40	11.6	50
TOTALES	96	29	125

$$\chi^2 = 0.1056 \quad \chi^2_{2g, 0.05} = 5.99$$

($p > 0.05$)

Ho : P1 = P2

Hi : P1 = P2 ESPERADO

ENSAYO	SOBREVIVIERON	NO SOBREVIVIERON	TOTALES
1	19.5	19.5	39
2	18	18	36
3	25	25	50
TOTALES	65.5	65.5	125

$X^2 = 35.9877^{**}$ $X^2_{2g} 0.05 = 5.99$ ($p > 0.05$)

$X^2_{2g} 0.01 = 9.21$ ($p < 0.01$)

Los resultados de la comparación de los dos sistemas presentados en este trabajo se encuentran descritos en la tabla 9. Un total de 289 ovocitos se sometieron a los procesos de maduración *in vitro* y vitrificación, repartidos en 2 sistemas, para el primero se destinaron 143 ovocitos que se vitrificaron y maduraron *in vitro* distribuidos en tres ensayos, así mismo para el segundo sistema, ovocitos se maduraron y posteriormente se vitrificaron un total de 146 ovocitos distribuidos en tres ensayos. Los porcentajes de sobrevivencia para el primer sistema fueron 41.3%, 39% y 51.7% respectivamente. Para el segundo sistema los porcentajes de sobrevivencia se comportaron de la siguiente manera 63.8%, 64.3% y 68.4% respectivamente. Cuando se comparó estadísticamente los dos sistemas, se encontró una diferencia significativa de ($p < 0.05$) con un 95% de confiabilidad, por lo que se rechazó la H_0 y se concluye que la proporción de sobrevivencia es diferente empleando distintos sistemas, siendo favorable para los óvulos que fueron madurados y posteriormente vitrificados.

TABLA N° 9 COMPARACIÓN DE OVULOS EN VESICULA GERMINAL Y METAFASE-II QUE SOBREVIVIERON A LA VITRIFICACIÓN ANTES Y DESPUES DE LA MADURACIÓN IN VITRO

ENSAYO	SOBREVIVENCIA DE ÓVULOS VITRIFICADOS Y MADURADOS		SOBREVIVENCIA DE ÓVULOS MADURADOS Y VITRIFICADOS		TOTALES DEL ESTUDIO
1	19/46	41.3%	30/47	63.8%	49
2	16/41	39.0%	27/42	64.3%	43
3	29/56	51.7%	39/57	68.4%	68
TOTALES	64/143	x = 44.7%	96/146	x = 65.75%	160/28 55%

Ho : P1 = P2

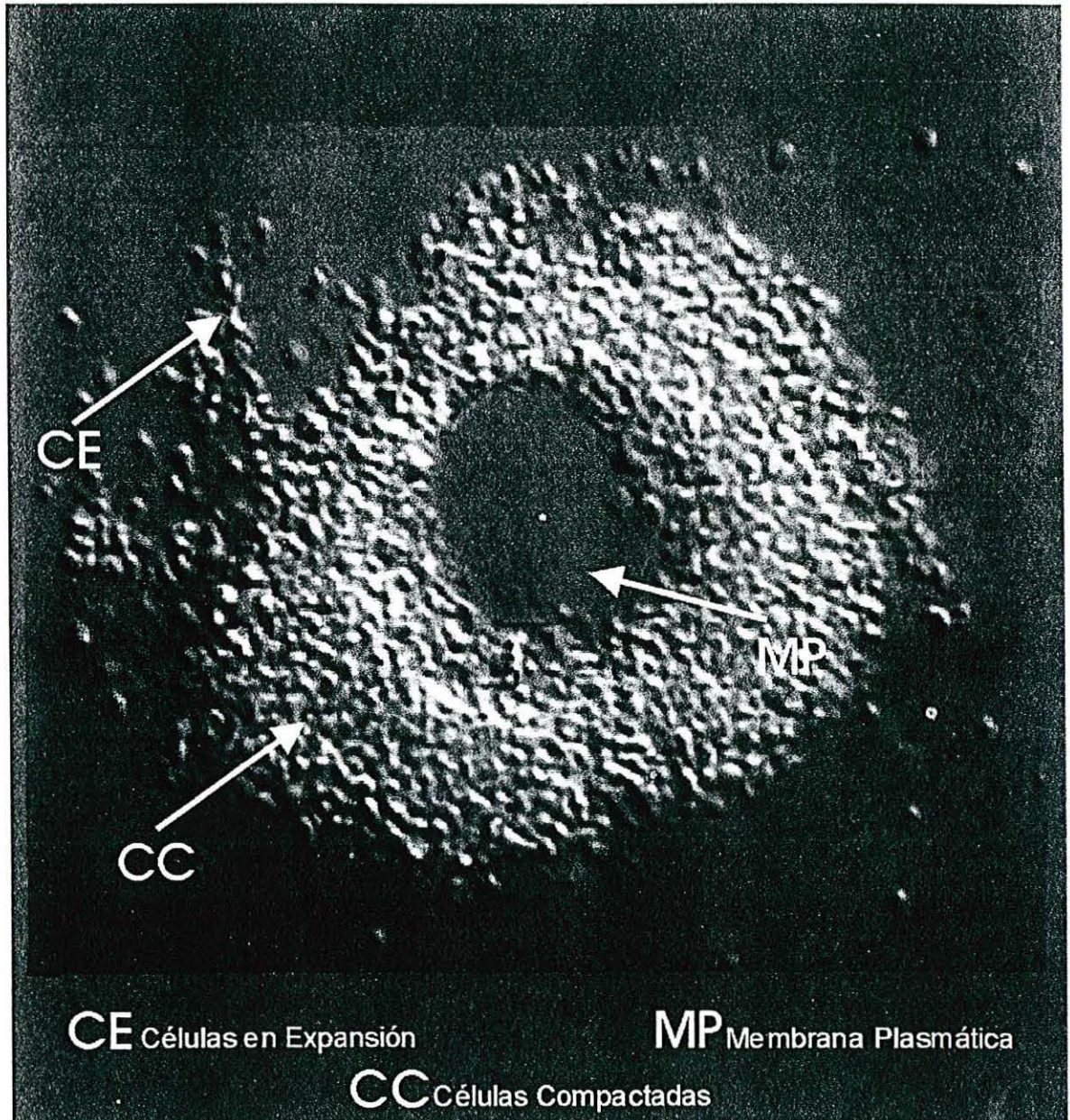
Hi : P1 = P2 ESPERADO

ENSAYO	SOBREVIVENCIA DE ÓVULOS VITRIFICADOS MADURADOS	DE Y	SOBREVIVENCIA DE DE ÓVULOS MADURADOS Y VITRIFICADOS	TOTALES DEL ESTUDIO
1	24.5		24.5	49
2	21.5		21.5	43
3	34.0		34.0	68
TOTALES	80.0		80.0	160

$\chi^2 = 6.7539$ $\chi^2_{2g} 0.05 = 5.99$ ($p > 0.05$)

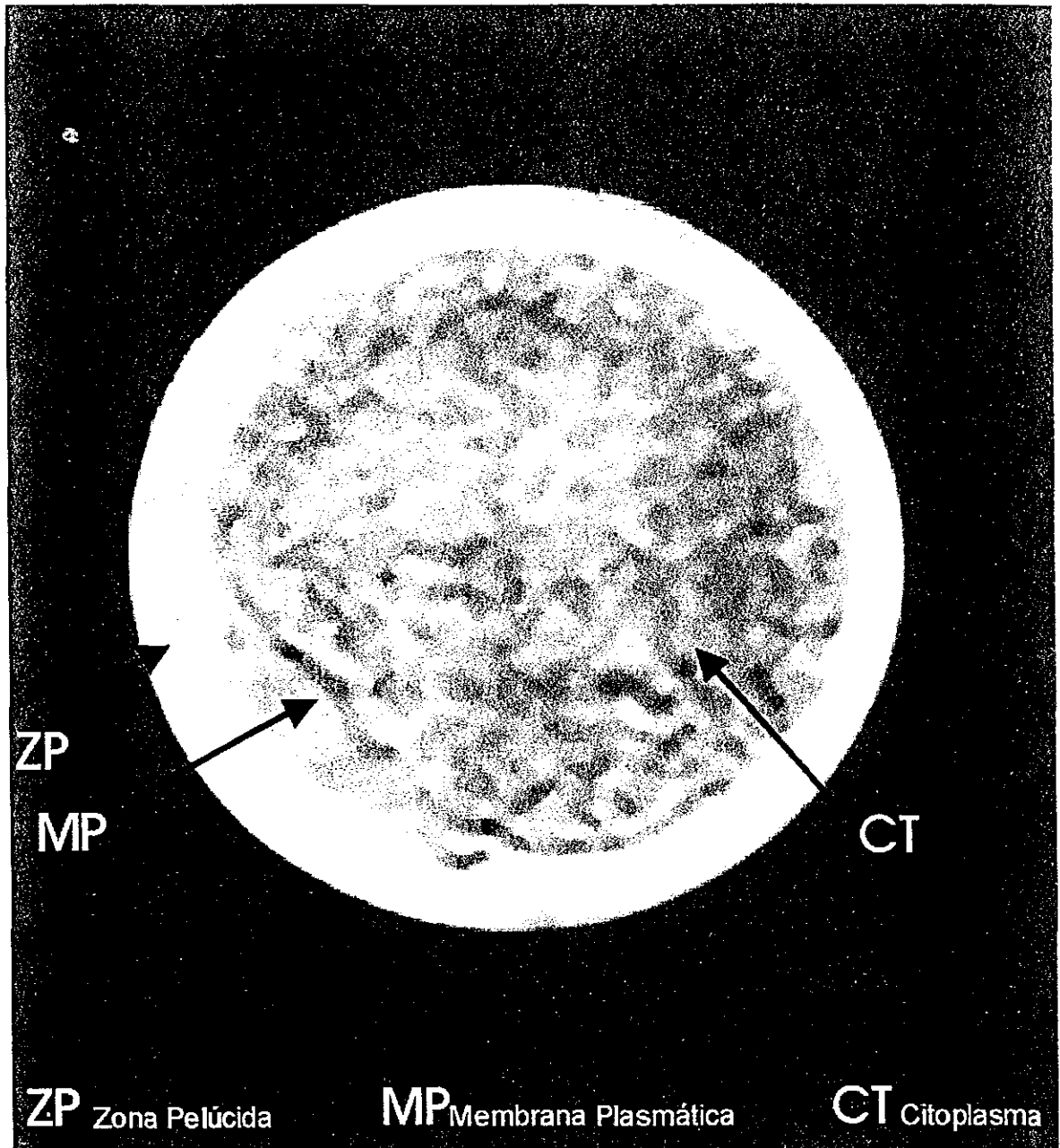
$\chi^2_{2g} 0.01 = 9.21$ ($p < 0.01$)

En la figura 1 se muestra un ovocito de bovino madurado in vitro rodeado por células de la granulosa que se muestran descompactadas, ya que en los espacios entre estas se nota su separación, además, aparece la membrana plasmática intacta así como un color homogéneo de las células que la recubren. Las células de la granulosa forman una roseta señalando que ha completado su maduración hasta la metafase II el ovocito.



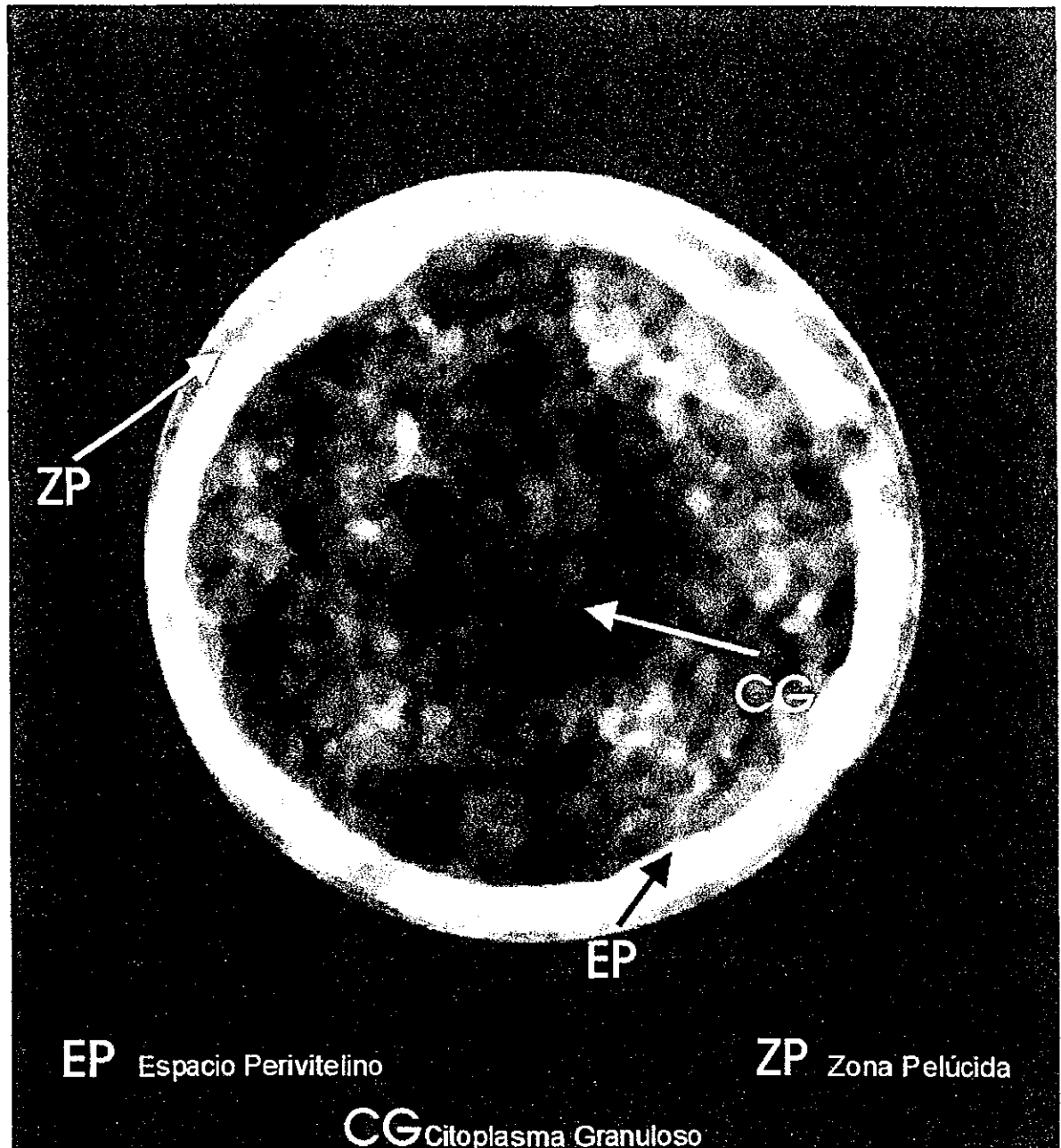
Fotografía tomada con una amplificación de 100X en un equipo Wild M-12 con cámara de video hitachi MKP-51 color y digitalizado con el programa ComputerEyes/1024 ver. 1.01 feb./95

En la figura 2 se muestra un ovocito de Bovino madurado in vitro rodeado por células de la corona radiada, así mismo el ovocito se vitrificó en el estado de vesícula germinal por lo que muestra una respuesta retardada en la expansión del ooplasma el Espacio Perivitelino está agrandado por la integración del agua.



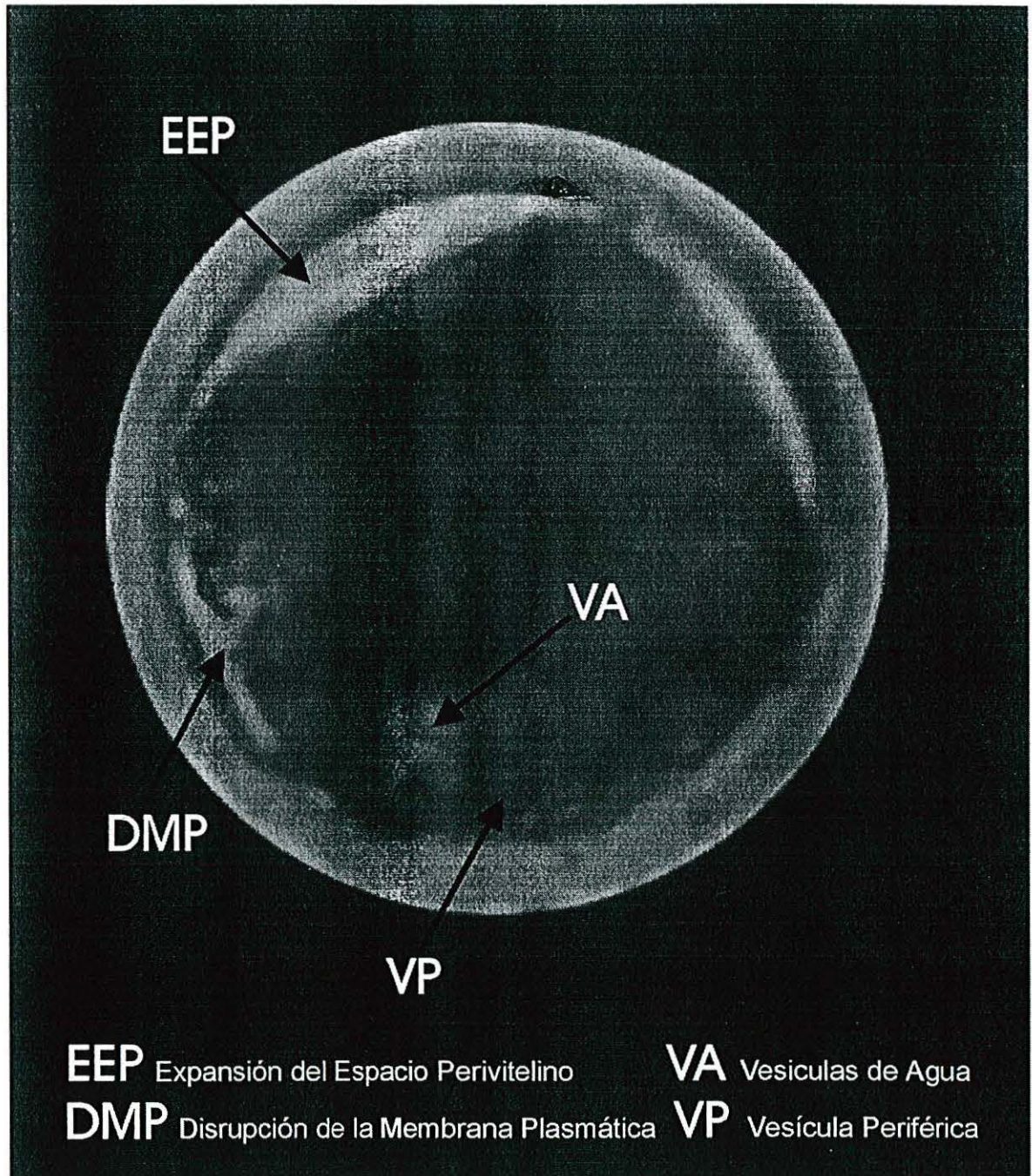
Fotografía tomada con una amplificación de 100X en un equipo Wild M-12 con cámara de video hitachi MKP-51 color y digitalizado con el programa ComputerEyes/1024 ver. 1.01 feb./95

En la figura 3. Se muestra un ovocito de bovino vitrificado que previamente a sido madurado in vitro, presentando una granulación citoplasmática homogénea y una unión entre la membrana plasmática y la zona pelúcida, por lo que su expansión retorna a sus límites normales.



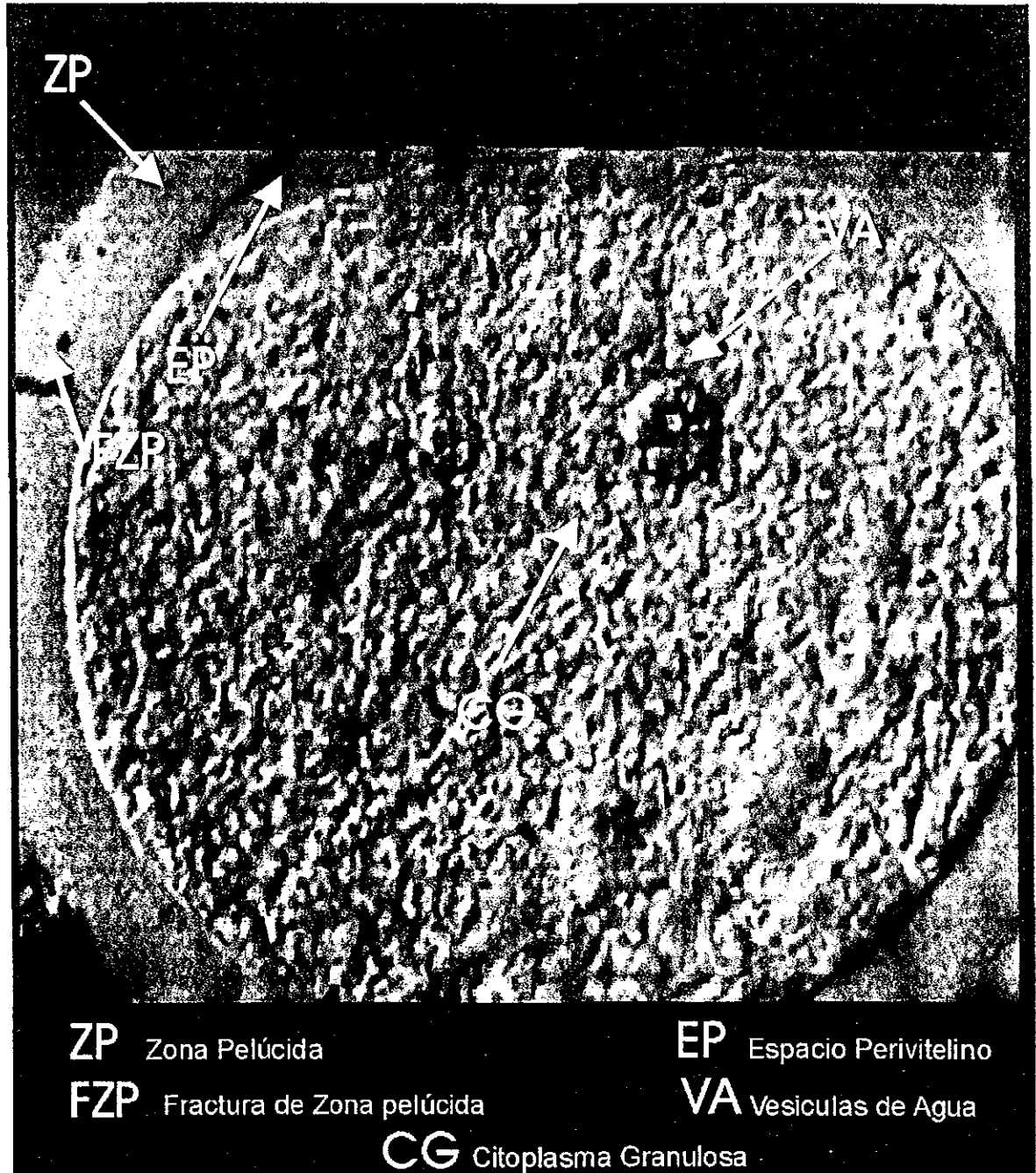
Fotografía tomada con una amplificación de 100X en un equipo Wild M-12 con cámara de video hitachi MKP-51 color y digitalizado con el programa ComputerEyes/1024 ver. 1.01 feb./95

En la figura 4 se muestra un ovocito madurado in vitro y vitrificado, éste no sobrevivió puesto que se ve el efecto de vesiculación perivitelina de granulación en este espacio de la periferia del ooplasma, desuniformidad del mismo en cuanto a su granulación, además presenta una disrupción de la membrana plasmática.



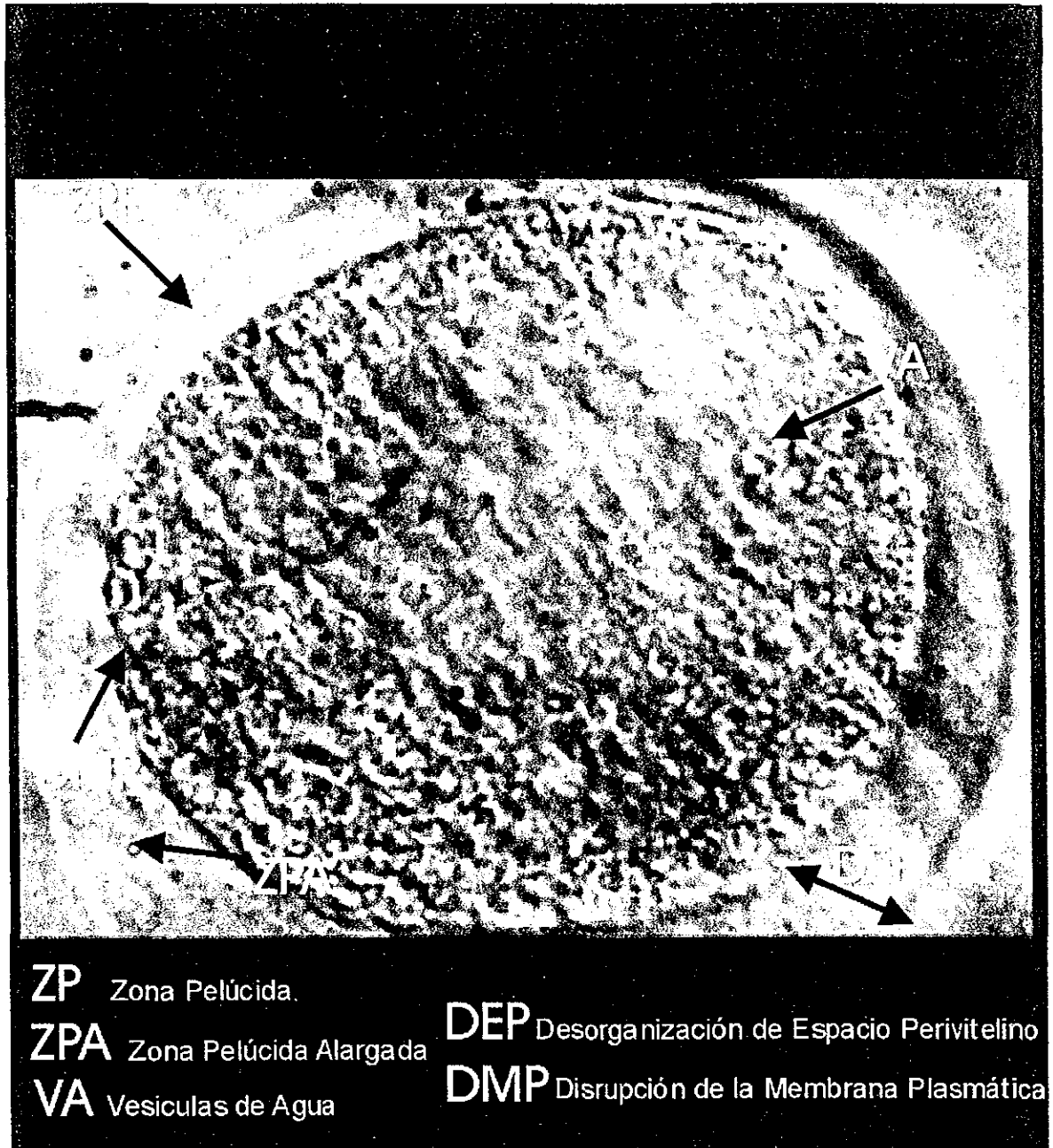
Fotografía tomada con una amplificación de 100X en un equipo Wild M-12 con cámara de video hitachi MKP-51 color y digitalizado con el programa ComputerEyes/1024 ver. 1.01 feb./95

En la figura 5 muestra un ovocito en estado de vesícula germinal y vitrificado; se observa una buena granulación del ooplasma, sin embargo presenta fallas en la expansión del espacio Perivitelino, al centro se observa una formación de vesículas de agua en forma de roseta. La zona Pelúcida presenta una fractura producto del ascenso brusco de temperatura.



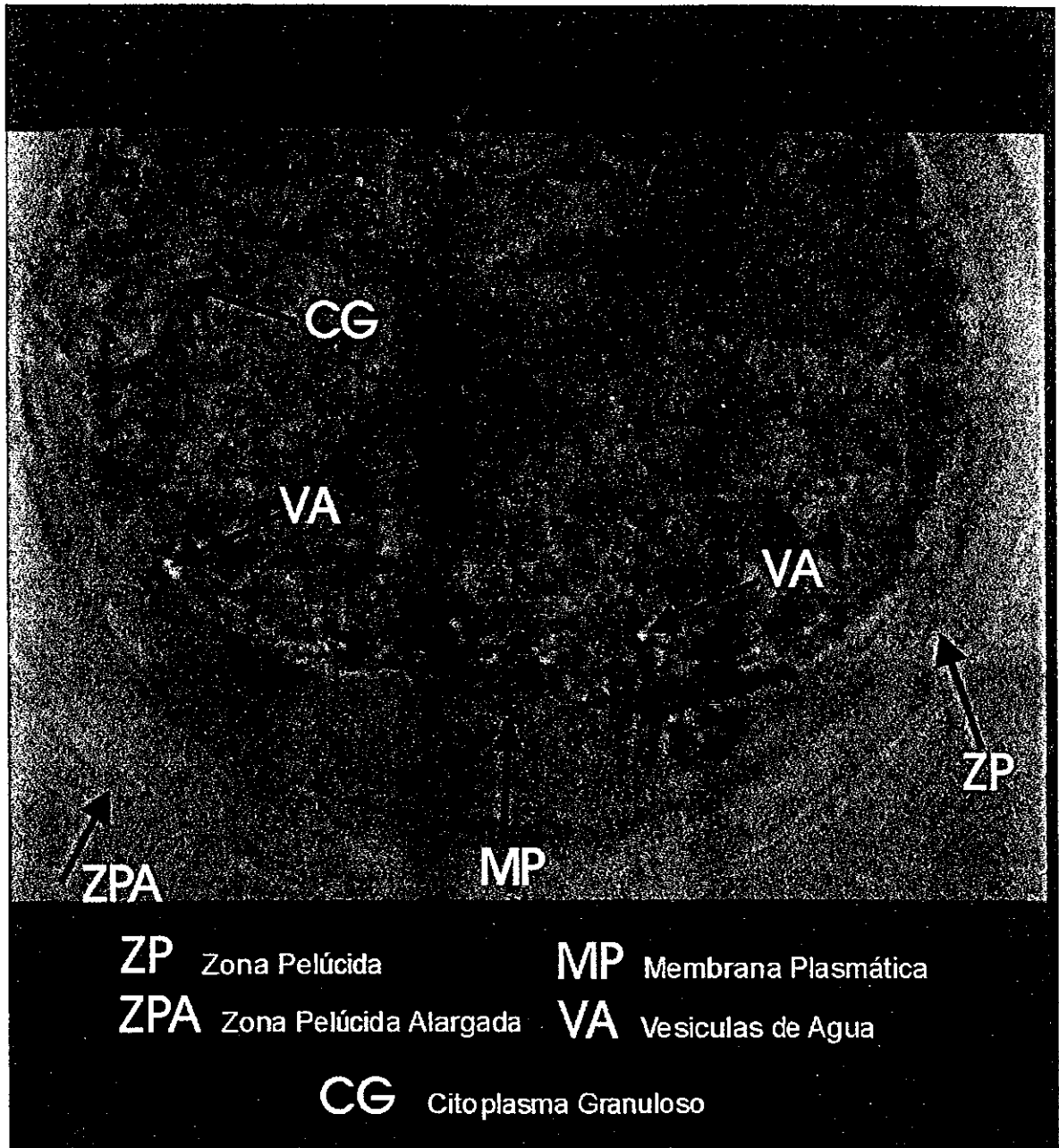
Fotografía tomada con una amplificación de 400X en un equipo Wild M-12 con cámara de video hitachi MKP-51 color y digitalizado con el programa ComputerEyes/1024 ver. 1.01 feb./95

En la figura 6 se muestra un ovocito vitrificado en estado de vesícula germinal y sometido al proceso de maduración in vitro el cual, presenta fallas en la organización de la membrana plasmática así como una desorganización de la Zona Pelúcida (Problemas de expansión Post Vitrificación) este ovocito no completó su maduración hasta la Etapa de Metafase II.



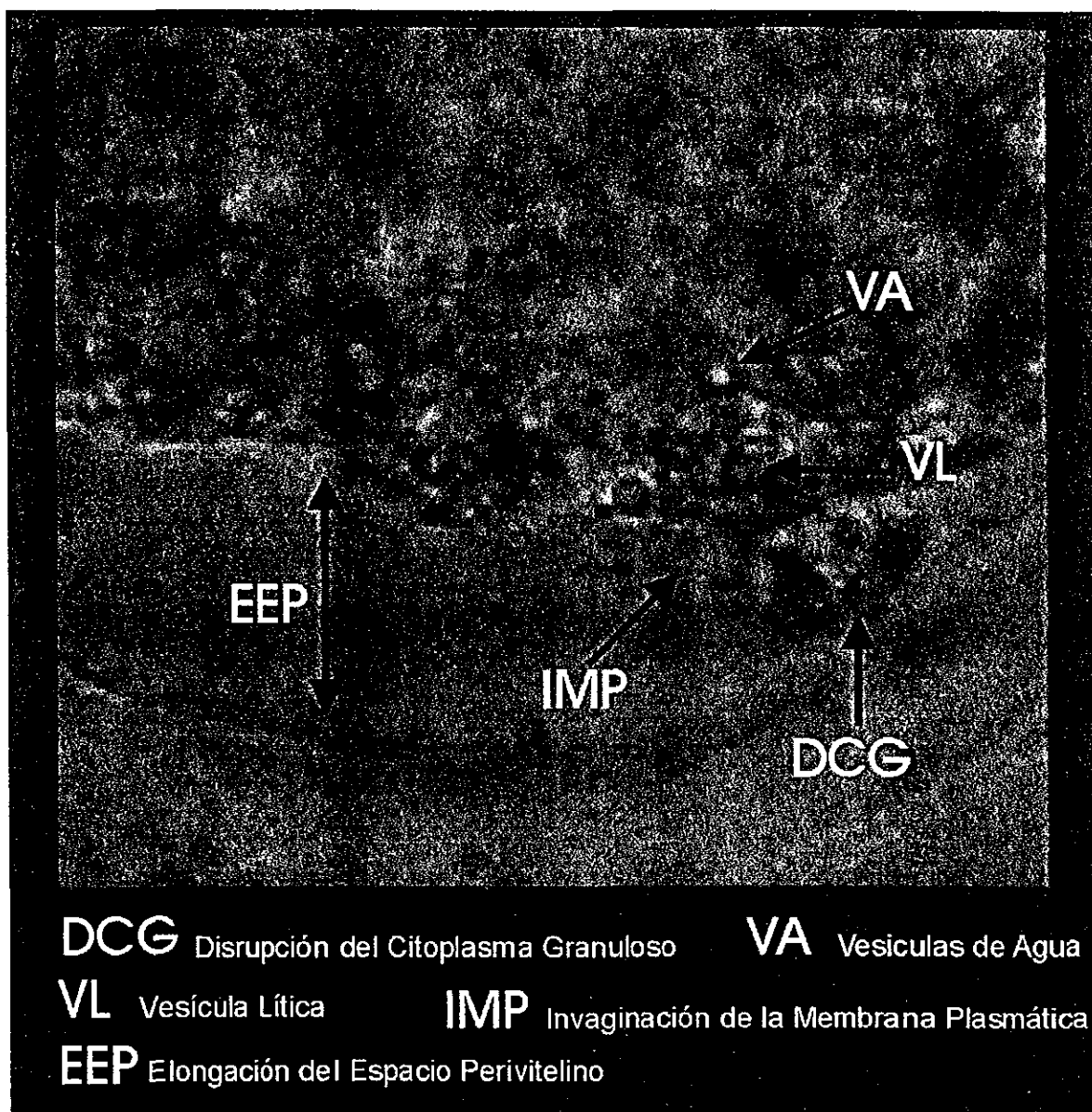
Fotografía tomada con una amplificación de 400X en un equipo Wild M-12 con cámara de video hitachi MKP-51 color y digitalizado con el programa ComputerEyes/1024 ver. 1.01 feb./95

En la figura 7 Se muestra un ovocito madurado in vitro, vitrificado y descongelado. Este presenta irregularidades en diferentes zonas; en la expansión del ooplasma espacio perivitelino alargado, formación de vesículas de agua y desorganización de la membrana plasmática, e invaginación de ésta dentro del Espacio Perivitelino.



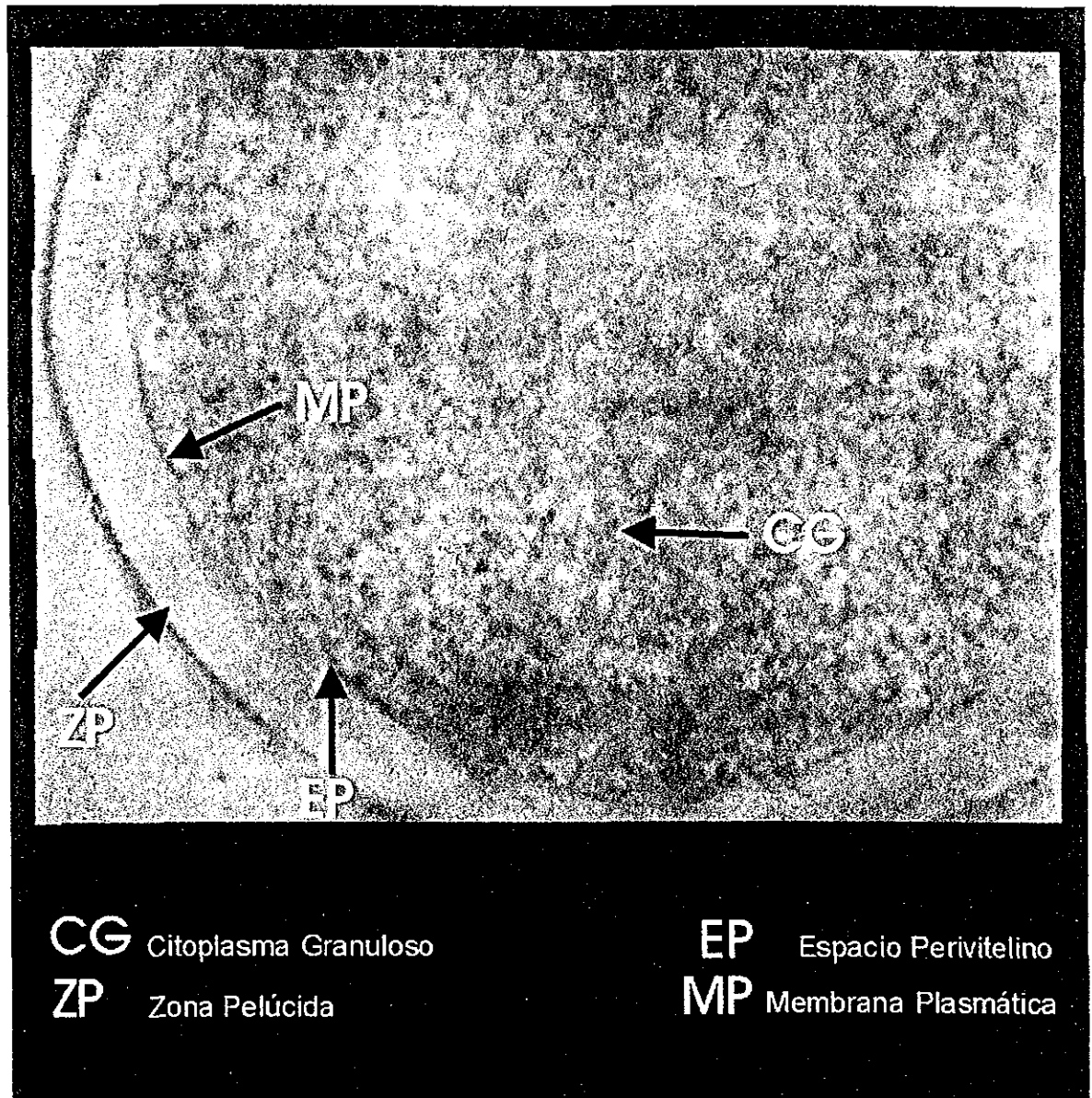
Fotografía tomada con una amplificación de 400X en un equipo Wild M-12 con cámara de video hitachi MKP-51 color y digitalizado con el programa ComputerEyes/1024 ver. 1.01 feb./95

En la figura 8 se muestra una ampliación de un ovocito de la figura anterior ésta ampliación muestra el daño al cual es sometido el ovulo a procesos de compactación y expansión. Las estructuras que más daños presentan son: cambios en la uniformidad en el citoplasma granuloso, la discontinuidad de la membrana plasmática, desuniformidad del espacio perivitelino, y cambios en los espacios que ocupan cada uno de los organelos citoplasmáticos, así como la desuniformidad de la zona pelúcida.



Fotografía tomada con una ampliación de 600X en un equipo Wild M-12 con cámara de video hitachi MKP-51 color y digitalizado con el programa ComputerEyes/1024 ver. 1.01 feb./95

En la **figura 9** se muestra un ovocito madurado in vitro, vitrificado y evaluado al descongelamiento. Este presenta un ooplasma homogéneo granulado y continuo, una unión firme entre la membrana Plasmática y la Zona Pelúcida, ésta última presenta una continuidad en su estructura y uniformidad alrededor del ovocito.

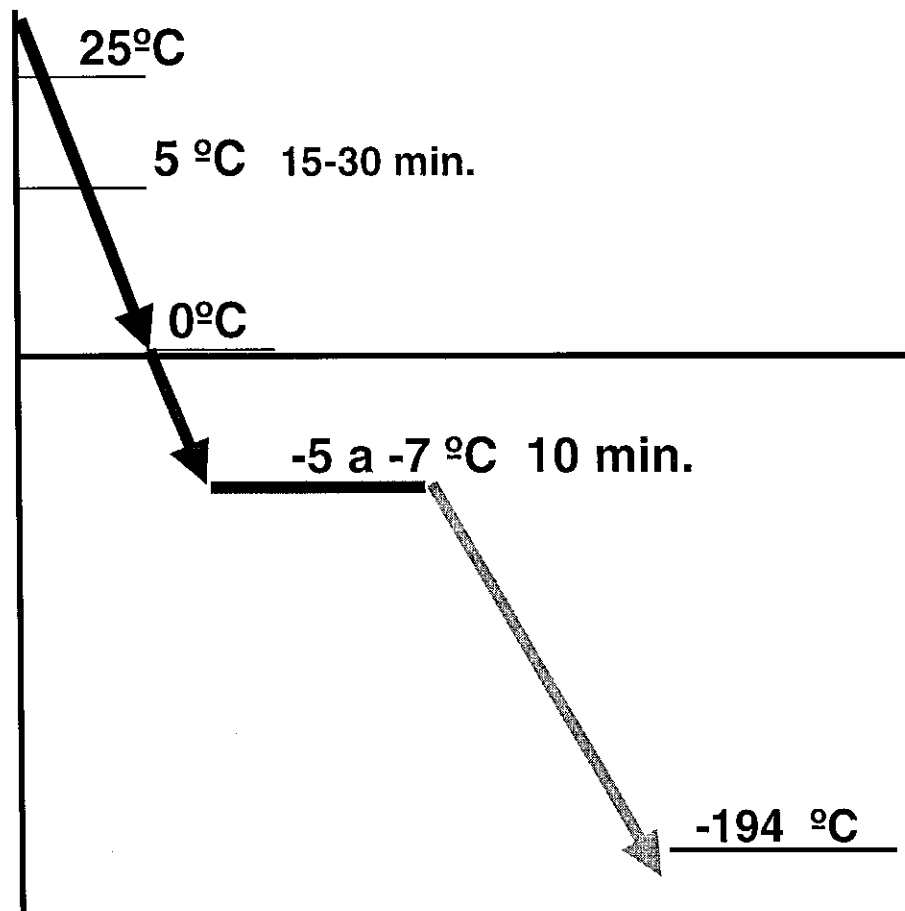


Fotografía tomada con una amplificación de 600X en un equipo Wild M-12 con cámara de video hitachi MKP-51 color y digitalizado con el programa ComputerEyes/1024 ver. 1.01 feb./95

FIGURA 10. CURVA DE DESCENSO DE TEMPERATURA.

En esta gráfica se muestra el descenso de temperatura para inducción del proceso de vitrificación, el cual permite estabilizar los compartimentos que existen internamente entre las membranas y la zona pelúcida en el ovocito.

Para el eje de las Y la variable es la temperatura medida en grados centígrados y por el eje de las X es el tiempo medido en minutos.



VI I.- DISCUSIÓN

Los resultados en la colección y la eficiencia en la aspiración son descritos en la tabla 3. de la siguiente manera: de 51 ovarios colectados en tres ensayos se aspiraron un total de 443 ovocitos observándose una eficiencia en la aspiración promedio de 8.7 ovocitos por ovario.

Si se comparan estos resultados con otros autores los cuales utilizaron técnicas de aspiración similares a las de este trabajo como es el mencionado por (Otoi.,1993), donde se obtiene una "eficiencia" en la aspiración de 5 a 10 ovocitos por ovario; Fry, (1996) obtuvo por el mismo método un promedio de aspiración de 8.1 ovocitos por ovario.

Al comparar los resultados de este trabajo se muestran ligeramente por arriba del promedio de aspiración obtenido por los autores citados anteriormente. Lo que lleva a reflexionar lo siguiente; en que parte de la técnica se esta trabajando eficientemente, esto puede ser debido al tipo de material que se este usando jeringas de 3 y 5 ml y agujas menores al numero 21 o a la propia capacitación del técnico, ya que este requiere una buena habilidad para aspirar eficientemente (aspirando gran cantidad de ovocitos en las mejores condiciones posibles). Los medios mas comúnmente utilizados en la aspiración de ovocitos son: TALP-HEPES, PBS, y TCM-199, entre otros.

Se han realizado diversos estudios con el fin de determinar si el diámetro del folículo influye sobre la viabilidad para la MIV de ovocitos de bovino. Cuando se han utilizado folículos de 0.5 a 2 mm. de diámetro para ser aspirados, se ha observado que estos ovocitos no tienen la capacidad de entrar en el proceso de desarrollo (reiniciación de la maduración nuclear), ya que presentan una incompetencia meiótica y se encuentran en un estado de atresia por lo cual difícilmente sobrepasan las primeras fases embrionarias (Gordon and Lu.,1990). A la vez, al ser sometidos al proceso de MIV, no presentan ningún indicio de reanudación meiótica, ya que se observa una falta de homogeneidad del ooplasma, además de no poseer un verdadero espacio perivitelino visible al entrar

en el sistema de maduración, comparado con folículos mayores a 2 mm. donde este espacio si es plenamente desarrollado (Gordon and Lu.,1990).

Se han aspirado folículos que van desde los 2 a 8 mm. de diámetro, en este grupo la gran mayoría de investigadores coinciden en que estos folículos proporcionan ovocitos que reúnen las características siguientes; la población tiende a ser muy homogénea, ya que parte de un estado de madurez nuclear igual o muy similar siendo este el estado de dictiotene de la primera meiosis, por lo cual es llamado estado de vesícula germinal GV al presentar en la parte central del ooplasma una zona clara, un espacio perivitelino muy estrecho, una zona pelúcida gruesa, una corona radiada compactada a las células del cúmulus. Los resultados de maduración de ovocitos provenientes de este grupo de folículos son los mas altos ya que se encuentran citados de un 80 a 90% de desarrollo en maduración (Fry, et al., 1996).

Cuando se han utilizado folículos mayores a 8 mm. de diámetro, se ha encontrado que los grupos de ovocitos son poco homogéneos, ya que estos se encuentran en diferentes fases de maduración al iniciarlos en el sistema *in vitro* que esta comprendido entre 20 a 28 horas de cultivo, por lo cual los períodos intermedios del estado de GV a MII son difíciles de determinar, al igual que las horas necesarias para que cada ovocito obtenga su estado de madurez, cosa que no es nada práctico en un sistema *in vitro*, ya que se estaría manipulando continuamente los ovocitos.

Se ha observado que el estadio del ciclo estrual no tiene ningún efecto sobre los ovocitos madurados *in vitro* cuando provienen de folículos que van de 2 a 8 mm. de diámetro, los cuales son colectados por aspiración, además, se ha encontrado una correlación del tamaño de los folículos con el diámetro del óvulo, ya que ovocitos con 120 micras de diámetro o mas son los buenos prospectos para madurar y soportar un desarrollo completo.(Otoi et, al.1997)

Los resultados de la tabla 4, de acuerdo al sistema de clasificación propuesto en este trabajo para ovocitos aspirados basados en las clases A, B y



C, D, muestra que se obtuvo en total 443 ovocitos repartidos 289 y 154 respectivamente para cada grupo.

Cuando se compararon los resultados con otros autores se encontró una variación muy importante en la calidad de los ovocitos recuperados con sus investmentas completas y compactas como lo reporta (Fry, et al., 1996). Donde hace mención a la presión de la aspiración del líquido folicular de 55 mmHg, siendo satisfactorio para la recuperación de ovocitos en las clases A y B, mientras que elevando la presión a 100 y 200 aumenta dramáticamente la clase D, donde los ovocitos se encuentran desnudos, por lo que los índices de maduración y desarrollo para esta clase son pobres.

Los criterios que han establecido una buena obtención del complejo cúmulus ovocito COCs incluyen una serie de células del cúmulus completa y compacta, un ooplasma homogéneo y finamente granulado y un ovocito que mida por lo menos 120u de diámetro. (Fry.,1997).

En cuanto a los ovocitos deformes, estos se encuentran en degeneración, o estados de atresia avanzados, los ovocitos averiados normalmente se encuentran cuando la aspiración ha sido violenta, a la vez cuando el técnico llega a averiar con el bisel de la punta al no estar bien redondeada la pipeta Pasteur modificada (comúnmente utilizada). Cuando el ooplasma del ovocito presenta zonas con manchas oscuras, se ha relacionado con fallas en su desarrollo o estados de atresia o necrosis (Loos et, al.,1989).

Otras características son exclusivas para los procesos de degeneración como son la expansión en una inadecuada forma de las investmentas del cúmulus. Esto puede ser fácilmente distinguible por la expansión durante la maduración, porque las células del cúmulus son expandidas en una forma radiada y ordenada, las áreas libres de organelos también caracteriza a la degeneración.

Cuando los ovocitos son bien clasificados "clase A" (ooplasma granulado, homogéneo en su tonalidad, espacio perivitelino compacto, células del cúmulus

bien compactas, mínimo 3 capas) provee un desarrollo aceptable en su maduración (Loos et, al.,1989).

La vitrificación de ovocitos en estado de vesícula germinal se muestran en la tabla 5 donde se trabajaron un total de 143 ovocitos de los cuales sobrevivieron 28/60%, 22/53% y 36/64% para los tres ensayos, respectivamente, promediando un 60% de sobrevivencia. Cuando se compararon estos resultados con los obtenidos por Barnes, (1997) quien obtuvo una sobrevivencia de 142/210, promediando un 67% de ovocitos vitrificados en estado de vesícula germinal se ve que existe una relación en el uso de esta etapa de maduración nuclear donde se obtiene una sobrevivencia aceptable. Así mismo Younis et, al.,(1997) obtuvo una sobrevivencia de 70 % basados en juicios de morfología, además reporta un retraso severo en el desarrollo de estos ovocitos. Kuchenmeister, (1997) reportó la vitrificación de ovocitos en estado de vesícula, y la sobrevivencia que obtuvo fue de 37/88, con un 42 % de ovocitos que iniciaron su desarrollo.

Las comparaciones nos permiten afirmar y concluir que las diferencias entre los porcentajes de sobrevivencia, para esta parte del trabajo, son relativamente superiores a las encontradas por kuchenmeister, (1997) y ligeramente inferiores por los trabajos de Barnes, (1997) y Younis et, al.,(1997). Las diferencias podrían estar en el uso de crioprotectores diferentes, tales como; el Etilen glicol o mezclas con glicerol en diferentes proporciones, el uso de TCM-199 como medio de soporte y PBS, la adhesión de Citokalacina B (Cyt-B). Los tiempos y las temperaturas de equilibrio y descenso son importantes, ya que permiten establecer uniformidad en la organización subcelular, en los puntos críticos de cambios de estado.

Los resultados obtenidos en la maduración de ovocitos *in vitro* son observados en el tabla 6, donde la maduración de ovocitos *in vitro*, después de haber sobrevivido a la vitrificación fueron suplementados con gonadotropinas y suero en TCM-199 y a la vez clasificados en las clases GV, MI, MII; para los ovocitos que completaron su maduración se obtuvieron los siguientes

resultados: 67%, 72.7% y 80.5%, respectivamente para cada una de las clases, promediando un 74.4%. Al comparar estos resultados con los reportados por Barnes, (1997) quien obtuvo, después de la maduración de ovocitos que sobrevivieron a la vitrificación, 119/185 un 64.3% de sobrevivencia. De la misma manera Younis, et, al.(1997) reporta de 72/88 82% de ovocitos que maduraron hasta metafase II. Encontramos que las diferencias siguen manifestándose en proporciones similares a las de la sobrevivencia de los ovocitos cuando se vitrificaron, por otra parte los medios de maduración, así como las técnicas de juicio son las mismas reportadas por los autores antes mencionados. Lo que nos indica que hay una correlación entre el daño que es causado por el congelamiento y el estado de desarrollo del ovocito en las clasificaciones A y B al inicio del programa.

La maduración *in vitro* de ovocitos, partiendo del estado de vesícula germinal, se muestran los resultados en la tabla 7, ovocitos clasificados después de ser aspirados de los folículos en las categorías A y B, las cuales pretenden obtener un gran número de células de la granulosa que acompañen al ovocito en su desarrollo y maduración, tanto citoplasmática como nuclear, cuando estos se sometieron al sistema de maduración con gonadotropinas (FSH, LH), suero fetal bovino y en un medio de base rico en nutrientes conteniendo los 20 aminoácidos esenciales, con el suministro de antibióticos. Los resultados de ovocitos que maduraron hasta MET-II fueron: 83%, 86% 88%, respectivamente para los tres ensayos. Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos bajo similares sistemas de maduración *in vitro* encontramos que Otoi et.al, (1997) obtuvo en el estudio de correlación al diámetro de ovocito con la maduración hasta MET-II desde 110 a 130 micras un 47% a un 100%, Hochi et, al., (1997) reporta un 80.3% de ovocitos que completaron su maduración hasta MET-II. K.S et, al. (1996) encontró un 88% de ovocitos madurados en la misma etapa de desarrollo nuclear. Por lo que al hacer una comparación se deduce que los resultados obtenidos para esta parte del sistema son satisfactorios y se encuentran

aceptables para el desarrollo de técnicas para fertilización *in vitro* o clonación de núcleos en base a la maduración de ovocitos *in vitro*.

En la tabla 8 se reporta los datos obtenidos en la vitrificación de los óvulos previamente madurados *in vitro* y se encontró que la sobrevivencia fue de 77%, 75% y 78%, respectivamente para los tres ensayos, con un promedio de los tres de $X = 76.6\%$. IM K.S et, al.,(1997) reporta para esta variable un 77% de sobrevivencia de ovocitos que sobrevivieron post maduración, cabe mencionar que el crioprotector que utilizó fue el 1,2 propanidol. Cuando comparamos los resultados con los anteriormente reportados encontramos que los porcentaje de sobrevivencia son similares.

La comparación de los dos sistemas; el primero donde los ovocitos son vitrificados en VG y madurados *in vitro*, el segundo donde los ovocitos son madurados *in vitro* hasta MET-II y posteriormente son vitrificados se muestran en la tabla 9.

Los porcentajes de sobrevivencia para el primer sistema fueron 41.3%, 39% y 51.7% respectivamente. Para el segundo sistema los porcentajes de sobrevivencia se comportaron de la siguiente manera 63.8%, 64.3% y 68.4%, respectivamente. La comparación de ambos sistemas es importante, puesto que el interés es el de determinar cual de los dos sistemas es mas adecuado, por el cual se obtienen mas ovocitos que sobreviven y continúan su desarrollo celular y se liberan del arresto meiótico nuclear . En un ovocito en estado de vesícula germinal, su estado nuclear se encuentra en un arresto meiotico (dictiotene profase I), por lo que la actividad de sintesis es muy baja y el daño es menor. El tamaño promedio para un ovocito de bovino en esta etapa es de 25 a 35 micras, por lo cual la cantidad de agua es menor y se esperaría que sobreviviera con mayor facilidad comparado con uno de tamaño doble. Sin embargo, la sobrevivencia es inferior a los óvulos de mayor tamaño relacionados con estados de MET-I y MET-II. Los estudios de Schmidt et al., (1995) donde analiza el daño por congelamiento a nivel ultraestructural de ovocitos de bovino madurados *in vitro*, muestra una gran formación vesicular y

el desplazamiento hacia la zona periférica del ooplasma, además encontró una desorganización de organelos citoplasmáticos e inclusión de vesículas en mitocondrias. De la misma manera, Otoi et al., (1992) en un estudio similar al anterior, encuentran que las técnicas de congelamiento pueden causar cambios finos estructurales finos en el ooplasma, como un aclaramiento de este y una textura irregular, así mismo de un rompimiento de la zona pelúcida, un incremento en la incidencia de poliploidía, desorganización de la membrana plasmática y algo muy importante es el daño a microtúbulos en el ovocito. Se sabe que estos organelos son responsables, entre otras cosas, de la organización de dirigir el apareamiento de los cromosomas y en la segmentación del cigoto, por lo que el daño a este organelo es relevante en la sobrevivencia y el continuar su desarrollo hasta la maduración.



XIII.- CONCLUSIONES

- 1.- Conforme a la metodología utilizada en este estudio, se concluye que esta técnica puede ser replicada si se utilizan las mismas condiciones de trabajo, para obtener óvulos madurados y vitrificados *in vitro*.
- 2.- Se logró la sobrevivencia de ovocitos vitrificados en estado de vesícula germinal y madurados *in vitro* con un 44.7% de sobrevivencia.
- 3.- Se logró la maduración *in vitro* de óvulos hasta metafase II y se logró la vitrificación alcanzando una sobrevivencia del 65.7%
- 3.- Una adecuada clasificación morfológica, previa a la maduración, repercute directamente en el éxito de la obtención de altos porcentajes de maduración.
- 4.- De los dos sistemas propuestos de vitrificación, el sistema de maduración *in vitro* y vitrificación obtuvo el mejor índice de sobrevivencia.

IX.- BIBLIOGRAFIA.

Alberts B. D. Bray J. Lewis, M. Raf, K. Roberts and J. D.Watson.1989. Molecular Biology of the cell. Garland Publishing N.Y. p 860-863.

Barnes F.I., Damiani P., Looney C.R., DUBY R.T. 1997. The meiotic stage affects subsequent development of cooled bovine oocytes. Theriogenology (Abstract 1997).

Boquet, M, Selva, J. and Aurox, M., 1995. Effects of cooling and equilibration in DMSO, and Cryopreservation of mouse oocytes, on the rates of in vitro fertilization, development, and chromosomal abnormalities. Molecular Reprod. and Development, 40:110-115.

Douglas R. Macfarlane and Maria Forsyth,. 1990. Recent insights on the role of Cryoprotctive Agents in vitrification. Criobiology 27, 345-358.

First N.L. and J.J.Parrish 1987.In vitro fertilization:of ruminants.J.Reprod Fert. Suppl. 34:151-165.

Flemming, W.N. and Sacke, R.G.,1972. Fine structures of bovine oocyte from mature Grafian follicle. J. Reprod. Fertil., 29:203-213.

Friedler, S., Giudice, L.C. & Lamb, E.J., 1988. Cryopreservation of embryos and ova. Fert. Steril, 49:743-764.

Fry R.C., Naill E.M. Simpson T.L., Squires T.J. and Reynolds J. 1996.

The Collection of oocytes from bovine ovaries. Theriogenology 33:77-87

Gandolfi, F. Luciano,A.M. Modina, S. Ponzini, A. Pocar, P. Lauria, A. 1997 The in vitro developmental competence of bovine oocytes can be related the morphology of the ovary. Theriogenology 48: 1153-1160.

Gilbert Scott.f. 1994 Developmental Biology, Editorial Omega 74-86.

Gordon I, Lu KH. 1990 Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology 33:77-87

- Hafez, E.S.E. 1985. Reproducción e inseminación artificial en los animales domésticos 5 edición, Editorial Interamericana pagina 570.
- Heymann, Y., Smorang, Z., Katska, L. and Vincent, C.. 1986. Influence of carbohydrates, cooling and rapid freezing on viability of bovine non-mature oocytes or 1-cell fertilized, eqqs *Cryo-Letters*, 7:170-183.
- Hyttel, P. and Madsen, Y., 1987. Rapid method to prepare mammalian oocytes and embryos for trasmission electron microscopy. *Acta Anat.*, 129:12-14.
- Im K.S., Kang J.M. and H.S. Kim. 1997. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. *Therigenology* 47:881-891.
- Jondet, M., Domonique, S. and Scholler, R.,1984. Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte. *Cryobiology*, 21:192-199.
- Kasai. M., 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction science* 42, 67-75.
- Kastrop, P.M.M.,M.M. Bevers, O.H.J. Destree and Th. A.M. Kruip.1990.Changes in protein synthesis and phosphorylation patterns during bovine oocyte maturation in vitro. *J.Reprod.Fert.* 90:305-310.
- Kuchenmeister U. And Kuwayama M. 1993 In vitro Blastocyst formation after vitrification of inmature Bovine Oocytes. *Therigenology*, 39:703-712
- Ledezma H.J.,1991. Procedures for in vitro production of bovine embryos. Department of Animal Science,University of Missouri Columbia.
- Lehn-Jensen, H. 1986. Cryopreservation of bovine embryos. Dissertation, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen. 183pp.
- Leibo, S.P., 1992. Techniques for preservation of mammalian germ plasm. *Animal Biotechnology*, 3:139-153.

- Leibo, S.P., Martino, A., Kobayashi, S., Pollard, J. W. 1996. Stage dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science.*, 42 45-53.
- Loos de F., Vliet P. Van, Mautik P. Van, Tam Kruij, 1989 Morphology of immature Bovine oocytes, *Gamete Research* 24:1097-204
- Men, H.S. Che, W.Z. Yang and Zou R.j. 1997. Cryopreservation of Kunming mouse oocytes using slow cooling, ultrarapid cooling and vitrification protocols. *Theriogenology* 47: 1423-1431.
- Mohr, L. and Trounson, A.O., 1981. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 25:1009-1025.
- Otoi, T., Tachikawa, S., Kondo, S and Suzuki, T., 1992. Developmental capacity of bovine oocytes cryopreserved after maturation in vitro and of frozen-thawed of frozen human oocytes. *Gamete Res.* , 16:343-354.
- Otoi T., Yakamamoto K., Koyama N., Tachikawa S., and Suzuki T. 1997 Bovine Oocyte Diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48:769-774
- Otoi T., Tachikawa S., Kondo S., and Suzuki T., 1993 Development capacity of Bovine oocytes frozen in different cryoprotectants. *Theriogenology* 40:801-807
- Parks, J.E. and Ruffing, N.A., 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37:59-73.
- Pellicer, A., Lightman, A., Parmer, T.G., Behrman, H.R. & De Cerney, A.H., 1988. Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complex after cryopreservation. *Fert. Steril.*, 50:805-810.
- Prontbriand, D., A.K. Goff, K.P. Xu and W.A. King. 1989. Effect of steroids on protein synthesis in mature and in immature bovine oocytes, *Theriogenology* 31:240 (abstract)

Roa V.JJ, 1992: (Estandarización de las técnicas de fertilización in vitro en bovinos) Tesis de licenciatura de la carrera de Médico Veterinario Zootecnista Universidad de Guadalajara.

Schmidt M., Hyttel P., Avery B., Greve T., 1995. Ultraestructure of in vitro matured bovine oocytes after controlled freezing in 10% glycerol. *Animal reproduction Science* 37 281-290.

Sathananthan, A.H., Trouson, A. and Freeman, J., 1987. Morphology and fertility of frozen human oocytes. *Gamete Res.* , 16:343-354.

Sathananthan. A.H., Ng, S.C., Trouson, A.O., 1988. The effect ultrarapid freezing of meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res.*, 21:385-401.

Suárez Madin, J.C. 1997. Manual de física de la bajas temperaturas. Universidad de La Habana, Cuba.

Suzuki, T. and Otoi, T., 1993. Producing live calves from IVF with frozen-thawed bovine oocytes . *Symp. On Recent Developments in Embryo Biotechnology for Farm Animal*, Louisiana State University, P. 6-9

Tada N., Sato M., Amann E., and Ogawa S. 1993 A Simple and Rapid method for cryo-preservation of mouse 2-Cell Embryos by Vitrification: Beneficial Effect of Sucrose and Raffinose on their Cryosurvival Rate. *Theriogenology* 40:333-344

Thibiert, M, 1995. Statistics of the worldwide embryo transfer industry. *IETS. Embryo Transfer Newslettter*, 13:18-21.

Toner M., Cravalho E.G., Karel M., Armant D.R., 1991. Cryomicroscopic analysis of intracellular ice formation during freezing of mouse oocytes with out cryoadditives. *Criobiology* 28 55-71.

Vicent, C. and Johnson, M.H., 1992. Cooling, Cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxford Reviews of Reproductive Biologic*, 14:72-100.

Whittingham, D.G., 1977. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocyte previously stored at -196 C. *J. Reprod. Fertil*, 49:89-94.

Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P., 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 C and -269 C. *Science*, 178:411-422

Yiunis A.i., Keskinetepe L., Simplicio A.A., Gould K. and Brackett B.G. 1997. Effects of egta and cytochalasin-B during freezing and vitrification of immature and mature bovine and rhesus monkey (M. Mulatta) oocytes. *Biol Reprod*. 55:333-339.

ANEXO I.- METODO PARA PREPARAR LOS MEDIOS Y BASES PARA LA MADURACIÓN DE OVULOS IN VITRO

TALP-HEPES stock

Ingredientes en gramos:	500 ml
NaCl	3.33
K Cl	.1193
NaHCO ₃	.0840
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	.00280
Na lactato	.930 µl
CaCl ₂ 2H ₂ O	.1495
MgCl ₂ - CH ₂ O	.05
Rojo fenol	.050
Hepes	1.1915

MEDIO DE MADURACIÓN stock

Ingredientes en gramos:	250 ml
TCM-199	2.49753
NaHCO ₃	0.5550
Agua desionizada	250 ml

PIRUVATO stock**Ingredientes:**

Piruvato de sodio 0.0220 g.

Agua desionizada 10 ml

Nota: no usarlo
mas de 1 semana

ANTIBIÓTICO stock**Penicilina y estreptomicina stock.****Ingredientes:**

Penicilina G sódica .6017 g.

Sulfato de estreptomicina 1 g.

Agua desionizada
esterilizada al .9% de 100 ml

NaCl

Se recomienda 100 ul/ml

SULFATO DE GENTAMICINA stock

Ingredientes:

Sulfato de gentamicina	0.100 g
Agua desionizada esterilizada al .9% de NaCl	10 ml
Adicionar 10 ul/10 ml	

GONADOTROPINA STOCK

Ingredientes:

FSH (Schering contaminada con LH)	50 mg
Agua desionizada esterilizada al .9% de NaCl	5 ml 5 ug/ml
Hacer alícuotas de 5 ul en tubos y congelarlos, concentraciones de trabajo	

17 BETA ESTRADIOL STOCK

Ingredientes:

Estradiol	5 mg
Etanol	5 ml
Hacer alícuotas de un ml y congelar	

SUERO DE VACA EN ESTRO (SVE) stock 500 ml

Se inactiva a 56°C en baño María y se hacen alícuotas de 10, 20 y 50 ml las cuales se almacenan en el congelador.

MEDIO DE MADURACIÓN DE OVOCITOS.

Medio de maduración	8 ml
stock	2 ml
Suero fetal bovino	100 ul
(SFB)	10 ul
Piruvato stock	1 alícuota
Gentamicina stock	
FSH stock	

Ajustar el pH a 7.1 ya que este llegara a 7.4 al ser fertilizado con .22 micras después adicionar.

Estrógenos stock 10 ul por alícuota

MEDIO TALP-HEPES

TL-HEPES	500 ml
stock	1.5 g
Suero albúmina	5000 ul
bovina	250 ul
Piruvato stock	
Sulfato de	
gentamicina	
stock	

Ajustar el pH a 7.5 y filtrar con .22 micras a la osmolaridad de 255 a 270 miliosmoles.

MEDIO TCM-199

TCM-199 stock	250 ml
Suero fetal Bovino (SFB)	50 ml 100 ul
Gentamicina stock	2500 ul
Piruvato stock	

Ajustar el pH 7.1 y filtrar con microporo del .22 micras.

ANEXO II. METODO DE PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CONGELACION

1. SOLUCIÓN DE ALMACENAMIENTO PARA GLICEROL AL 10 %

- Medir 70 ml de M-PBS (GIBCO) en una probeta de 100 ml. Luego se adiciona 10 ml. de glicerol y se mezclan completamente.
- 8 ml de esta solución son puestos en tubos de ensayo y se almacenan en el congelador.
- Para utilizarlos, se descongela esta solución y se adiciona 10 ml. de solución de antibióticos (contiene PC. 1,000 I.U. + S.M. 1 mg) y 2 ml de suero de ternero (C.S). Finalmente la concentración del glicerol llega a ser del 10 %.
- Esterilizar la solución previamente mezclada con un filtro de 0.22 micras.

2. SOLUCIONES DE GLICEROL PARA EL EQUILIBRIO Y LA DILUCIÓN POR ETAPAS.

*Solución de Glicerol al 10%(como anteriormente se expuso)

*M-PBS = 20% C.S. (Solución de almacenamiento, se le adiciona 10ml de solución de antibióticos).

Las 2 soluciones se mezclan de la siguiente manera:

	1	3.3%	6.7%	10%
10% Glicerol	1	1.5	3.0	5.5 ml
M-PBS + C.S.	1	3.0	1.5	-

Estas soluciones de diferente concentración son esterilizadas por filtración y divididas en 2 placas pequeñas respectivamente.

Dilución por etapas con la adición de sacarosa. La manera de preparar las soluciones es la siguiente:

	3.3% Gli.	6.7% Gli.	Sac.
10% Glicerol	4.5 ml	9 ml	-
M-PBS + C.S	6 ml	1.5 ml	10.5 ml
1 M Sacarosa	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml

Solución de almacenamiento de Sacarosa al 10 % (Una Etapa en la Pajilla).

- Poner 10 g de sacarosa en una probeta de 100 ml y adicionar 60 a 70 ml de M-PBS. Una vez que la sacarosa este totalmente disuelta se aumentara M-PBS hasta llegar a los 80 ml.
- Una vez completamente mezclado, 4 ml de la solución se coloca en tubos de ensayo y se almacena en congelación.
- Para utilizarlo se descongela la solución y se adiciona 5 ml de solución de antibióticos (Pc. 500 U.I. + Sm. 0.5 mg) y 1 ml de C.S. Finalmente la concentración de sacarosa llega a ser el 10 %. Se esteriliza la solución con un filtro de 0.22 micras.