

CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS PRODUCIDOS *IN VITRO*

P. Rodríguez,^{1} C. Jiménez²*

Artículo recibido: 8 de octubre de 2010; aprobado: 9 de diciembre de 2010

RESUMEN

La criopreservación de embriones se ha venido desarrollando en los últimos años con el propósito de conservar embriones obtenidos de vacas superovuladas. Las investigaciones han continuado su desarrollo y se han dirigido hacia la criopreservación de oocitos y embriones *in vitro*, los cuales necesitan diferentes metodologías para lograr una supervivencia aceptable. Por consiguiente, los métodos tradicionales de criopreservación se han tenido que modificar para obtener mejores tasas de supervivencia poscriopreservación que serán discutidas en esta revisión.

Palabras clave: embriones, biotecnología, criopreservación, embriones producidos *in vitro*.

CRYOPRESERVATION OF *IN VITRO* DERIVED EMBRYOS

ABSTRACT

Embryo cryopreservation techniques have developed in order to preserve embryos obtained from superovulated cows. Research has followed trying to cryopreserve embryos and oocytes manipulated under *in vitro* conditions due to the low survival rates obtained with traditional cryopreservation methods. The different methodologies are discussed in the present review.

Key words: embryos, biotechnology, cryopreservation, *in vitro* produced embryos.

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos veinte años, se ha observado que la producción de embriones bovinos ha crecido de forma progresiva, en especial en el área de la producción *in vitro* (PIV), lo que ha hecho que esta se convierta en una técnica importante no solo en el ámbito científico, académico, sino también en el comercial. Consecuentemente, esto ha generado la necesidad de criopreservar

los excedentes de embriones de dicha producción. Sin embargo, la criopreservación de embriones producidos *in vitro* a través de los métodos convencionales, no ha alcanzado tasas de supervivencia satisfactorias (Vajta 2000). Debido a sus características físicas, principalmente en la membrana donde el embrión *in vitro* presenta una mayor cantidad de lípidos que impiden su fácil congelamiento, se ha optado por el empleo de métodos

1 Instituto de Reproducción Animal de Córdoba (Argentina).

2 Clínica de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Carrera 30 nro. 45-03, Bogotá (Colombia).

*Autor para correspondencia: prodriquezv@iracbiogen.com.ar.

alternativos como la vitrificación. Este método, con curvas de enfriamiento superiores a las de la congelación convencional, permite la reducción del tiempo de exposición del embrión en los puntos críticos de temperatura, con lo cual se disminuyen los daños térmicos y mecánicos causados durante la formación de hielo, y se aumenta la viabilidad de los embriones posteriormente a su vitrificación (Lazar et ál. 2000; Vajta y Kuwayama 2006; Mucci et ál. 2006). No obstante, es importante resaltar que a pesar del alcance conseguido con estas técnicas hasta hoy, aún es necesario el desarrollo de nuevos métodos y la búsqueda de nuevas perspectivas que optimicen la vitrificación de embriones producidos *in vitro*. La presente revisión pretende mostrar los avances en el área de la criobiología, en especial en el método de vitrificación, que constituye hoy en día la principal alternativa para la criopreservación tanto de oocitos como de embriones producidos.

Criopreservación de embriones

Con el nacimiento del primer bovino producido *in vitro* por Brackett et ál. (1982), la técnica de fertilización *in vitro* comenzó a ser reconocida mundialmente; sin embargo, su estado del arte hacía que fuera una metodología aún restringida al ámbito experimental, además de que las condiciones de mercado en la década de los ochenta y noventa restringían su aplicación comercial (Viana y Camargo 2007). Así mismo, la introducción de la transferencia de embriones *in vitro* estimuló el aumento no solo de la producción, sino también de la distribución de este tipo de embriones. Sin embargo, en algunos países se ha incrementado de forma cuantiosa el número

de embriones producidos, superando el número de receptoras, creando así la necesidad de criopreservar los embriones excedentes para su posterior comercialización alrededor del mundo (Viana y Camargo 2007; Cutaia y Bó 2007).

Uno de los principios más importantes de la criopreservación de embriones es lograr su almacenamiento en condiciones de bajas temperaturas (-196°C), intentando mantener su integridad a través de la remoción del máximo volumen posible de agua antes de su congelamiento, con lo cual se evita la formación de hielo (Seidel 1986). Dentro de los métodos más importantes para la criopreservación se encuentran el método de congelación convencional y el de vitrificación. El método de congelamiento fue el primero en ser introducido, y hoy es el más utilizado comercialmente (Vajta 2000). Su curva de congelación lenta permite mantener el equilibrio entre los factores que pueden causar daño celular, como la formación de cristales de hielo, la fractura del embrión, el daño tóxico y osmótico, así como las alteraciones de las organelas intracelulares y del citosqueleto (Vajta y Kuwayama 2006; Dobrinsky 1996; Vanderzwalm et ál. 2002). Durante este procedimiento, los embriones normalmente van a ser equilibrados dentro de bajas concentraciones de crioprotectores, en pajillas de inseminación de 0,25 ml, con tasas de enfriamiento entre 0,3 y 1°C/min, hasta alcanzar los -30 a -35°C, para posteriormente poder ser sumergidos en el nitrógeno líquido. Por su parte, la vitrificación es una metodología definida como la gelificación de un líquido, producida no por la cristalización, sino por una extrema elevación de la viscosidad durante el enfriamiento, por lo cual esta

es la única técnica de criopreservación que permite la eliminación total de la formación de hielo, tanto en la célula, como en el medio que la rodea (Fahy et ál. 1984). En la vitrificación, la curva de enfriamiento es más rápida ($\approx 2500^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y necesita de la presencia de crioprotectores más concentrados, que permitan la formación del llamado “estado vítreo”, que disminuye los daños químicos y mecánicos causados por el paso entre los puntos críticos de congelación (Dobrinsky 1996; Martino et ál. 1996). La formación del estado vítreo evita tales daños, al promover la distribución iónica del líquido e impedir la formación de cristales de hielo (Rall y Fahy 1985; Arav 1992; Kasai 2002).

Vitrificación frente a congelamiento

El congelamiento convencional tiene una ventaja comparativa frente a los otros métodos de criopreservación, al ser una metodología que permite la utilización de bajas concentraciones de crioprotectores y permite la transferencia directa de los embriones después de la descongelación (Volkel y Hu 1992). Sin embargo, su habilidad para prevenir la formación de hielo intracelular aún es limitada, además, los resultados *in vitro* de la criopreservación de embriones han sido variables (Hasler et ál. 1995; Massip et ál. 1995; Hochi et ál. 1996; Kaidi et ál. 2001) y menores en comparación a los datos obtenidos en embriones *in vivo* (Alvarenga et ál. 2007; Dinnyes y Nedambale 2009).

La razón por la cual existe esta variación en la viabilidad de los embriones producidos *in vitro*, en comparación con los producidos *in vivo*, es probablemente por las características físicas propias del primer tipo de embriones, que hacen

que sean más sensibles a bajas temperaturas (Dinnyes y Nedambale 2009; Rodrigues 1996; Vajta 1997). Entre dichas características, se encuentran diferencias no solo morfológicas sino también fisiológicas, como: 1) el aumento en el número de vacuolas (Shamsuddin et ál. 1992), 2) mayor fragilidad de la zona pelúcida (Duby et ál. 1997), 3) menor compactación embrionaria (Van Soom et ál. 1992), 4) un menor número de blastómeras, sobre todo en la masa celular interna (Iwasaki et ál. 1990; Rizos et ál. 2002), 5) alteraciones en la expresión génica (Niemann y Wrenzychi 2000; Lazzari et ál. 2002; Rizos et ál. 2003; Lonergan et ál. 2003), 6) mayor tasa de apoptosis (Pomar et ál. 2005) y 7) aumento en el alto contenido citoplasmático de lípidos (Massip et ál. 1995).

Por estas razones, y en especial la última, se ha considerado que el método de congelación convencional genera unas tasas de viabilidad considerablemente disminuidas en este tipo de embriones (Pereira y Marques 2008). El aumento de los tiempos de exposición, debido al descenso progresivo de la temperatura durante el congelamiento, permite que el embrión permanezca un tiempo mayor en la franja de temperatura termotrópica de la transición de los lípidos (16°C - 4°C), lo cual genera un mayor daño en la membrana, afectándolo considerablemente (Zeron et ál. 1999). Mucci et ál. (2006) confirmaron esta observación, al comparar la criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*; por medio de las dos metodologías, los autores observaron un aumento en la viabilidad 72 horas después del descongelamiento de los embriones que fueron conservados por medio de la vitrificación (114/265; 43%), en comparación con los que fue-

ron congelados (33/275; 12%). De igual forma, varios autores reportaron el aumento de las tasas de viabilidad no solo *in vitro*, sino también *in vivo*, después de la vitrificación, al comparar las dos metodologías (Hasler et ál. 1995; Kaidi et ál. 2001; Dinnyes et ál. 1995; Reinders et ál. 1995; Agca et ál. 1996; Lane et ál. 1999; Mezzalira et ál. 2004). Además, la vitrificación es una técnica que tiene otras ventajas comparativas frente a la congelación tradicional, ya que utiliza procedimientos más simples, no necesita de equipos costosos y requiere poco tiempo para su realización (Baril et ál. 2001).

Vitrificación

Gracias a sus posibles efectos benéficos, esta técnica ha tomado gran importancia en la criopreservación no solo de embriones *in vitro*, sino también de oocitos y embriones producidos *in vivo*. Sin embargo, desde el primer procedimiento realizado con éxito en embriones mamíferos por Rall y Fahy (1985), la vitrificación ha sufrido múltiples modificaciones, en el intento por simplificar sus procedimientos y mejorar las tasas de viabilidad. Algunas de estas tienen relación con el uso de diferentes crioprotectores, sistemas de empaque de los embriones u oocitos y el uso de nitrógeno súpercongelado.

Crioprotectores

Varios de los estudios han sido enfocados a la disminución de los efectos tóxicos y osmóticos causados por las altas concentraciones de los crioprotectores (Kasai y Mukaida 2004). La vitrificación, al ser una técnica que consiste en la criopreservación a través del aumento de la viscosidad de las soluciones crioprotectoras,

necesita de concentraciones de crioprotectores mayores (4-8 M) a las utilizadas normalmente en las técnicas convencionales de congelación (1-2 M) (Woods et ál. 2004). Por lo tanto, la búsqueda de la disminución de estos efectos deletéreos se ha encaminado a través de diferentes técnicas, como por ejemplo, el uso de crioprotectores menos tóxicos, el establecimiento de volúmenes mínimos, niveles de concentración menores por medio de la asociación de más de un crioprotector, la adición progresiva de los crioprotectores, así como cambios de temperatura y tiempos en el momento de su exposición (Liebermann et ál. 2003).

El uso de soluciones crioprotectoras con bajo peso molecular es una de estas estrategias; los crioprotectores, al tener una mayor permeabilidad, permiten la reducción de los tiempos de exposición y la concentración, con lo cual se previene el daño osmótico causado en la célula (Kasai y Mukaida 2004). Entre los crioprotectores de bajo peso molecular, el más usado es el etilenglicol (EG) (Massip 2001). Sin embargo, varios experimentos sugieren que crioprotectores como 1-2 propanediol (PROH), glicerol (GLY), dimetilsulfoxido (DMSO) y sus posibles combinaciones con otros crioprotectores, son igualmente buenos candidatos para ser empleados en la vitrificación de embriones (Ishimori et ál. 1992; Hubálek 2003). De igual forma, la asociación de uno o más crioprotectores con características más estables, permitirá la utilización de soluciones más simples y la reducción de su toxicidad específica. De acuerdo con algunos investigadores, la permeabilidad de la combinación de crioprotectores es mayor que la de sus componentes de forma individual (Vajta y Nagy 2006). La aso-

ciación más comúnmente utilizada en vitrificación es la compuesta por EG y DMSO (Mezzalira et ál. 2004; Vajta y Nagy 2006), sin embargo, esta puede ser reemplazada por otro tipo de combinaciones de agentes crioprotectores, como el EG y PROH, con lo cual se obtienen excelentes resultados en la vitrificación de embriones producidos *in vitro* y oocitos inmaduros (Vieira et ál. 2008). La adición de crioprotectores no permeables, tales como disacáridos (sucrosa, trealosa) o macromoléculas (Ficoll, polivinilalcohol (PVA), polivinilpirrolidona (PVP)), igualmente contribuye a la reducción de su toxicidad, ya que ayuda a disminuir las concentraciones del crioprotector dentro de las células (Kasai y Mukaida 2004; Liebermann et ál. 2003).

Sistemas de empaque

Los grandes volúmenes de crioprotectores también son limitantes de las tasas de enfriamiento. Los primeros elementos de empaque utilizados con éxito en la vitrificación de oocitos y embriones, fueron las pajillas de inseminación de bovinos, las cuales utilizaban relativamente grandes volúmenes ($> 20 \mu\text{L}$) y solo alcanzaban tasas de enfriamiento de $2.500^\circ\text{C}/\text{min}$ (Palasz y Mapletof, 1996). Posteriormente, con el desarrollo de empaques de menor volumen ($< 5 \mu\text{L}$), asociados con el contacto directo con el nitrógeno líquido, se logró aumentar las tasas de enfriamiento hasta casi los $30.000^\circ\text{C}/\text{min}$ (He et ál. 2008). La mayoría de estas formas de empaque, además permitieron la disminución de las concentraciones de los crioprotectores, reduciendo así el daño tóxico y mecánico causado por la vitrificación (tabla 1). Dentro de los principales sistemas de empaque desarrollados se encuentran: el

tamaño mínimo de la gota (MDS) (Arav 1992), las rejillas para microscopía electrónica (EM) (Martino et ál. 1996), las pajillas estiradas abiertas conocidas como *open-pulled straws* (OPS) (Vajta et ál. 1998), las asas para congelación o *cryo-loops* (Lane et ál. 1999), el volumen mínimo de congelación (MVC) (Hamawaki et ál. 1999), el sistema de hemi-pajilla (Vanderzwalm et ál. 2000), la superficie sólida de vitrificación (Dinnyes et ál. 2000), puntas *gel-loading tips* (Tominaga y Hamada 2001), pajillas estiradas cerradas *closed-pulled straws* (CPS) (Chen et ál. 2001), mallas de nylon (Matsumoto et ál 2001), pipetas flexibles, *flexipet denuding pipette* (FDP) (Liebermann et ál. 2002), pajillas estiradas abiertas superfinales *superfinely OPS* (SOPs) (Isachenko et ál. 2003), las micropipetas plásticas de diámetro fino (Cremades et ál. 2004), puntas de pipeta de $100 \mu\text{L}$ (Hredzak et ál. 2005), puntas de congelación *cryotip* y *cryotops* (Kuwayama et ál. 2005).

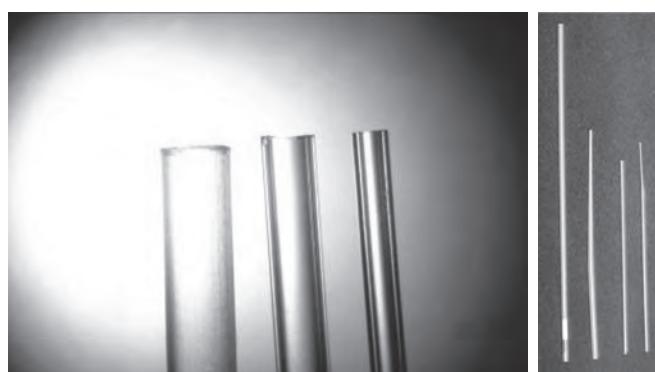
Dentro de estos sistemas, el método de empaque más usado es la OPS, la cual alcanza tasas de enfriamiento de más de $20.000^\circ\text{C}/\text{min}$, por lo que disminuye los daños tóxicos y osmóticos en las células (Vajta et ál. 1998). Sin embargo, modificaciones posteriores de este modelo consiguieron aumentar aún más las tasas de enfriamiento, al utilizar para su fabricación materiales distintos al plástico. El plástico, debido a sus características físicas, tiene una baja conductividad de calor, lo que limita las tasas de congelación, por lo tanto, el uso de otros materiales con mayor conductividad como el vidrio (Mezzalira et ál. 1999), el metal (Bunn et ál. 2006) o el cuarzo (He et ál. 2008), permiten aumentar el intercambio de calor y las tasas de enfriamiento, alcanzando velocidades de casi

TABLA 1. Viabilidad posvitrificación de embriones bovinos producidos *in vitro* en diferentes tipos de empaque

Método	Autores	Viabilidad	
		% Eclosión	% Preñez
Pajilla 0,25 mL	Massip et ál. (1987)	-	38%
Open pulled straws (OPS)	Vajta et ál. (1998)	94%	-
Cryoloop	Lane et ál. (1999)	80%	-
Mínimo volumen de congelación (MVC)	Hamawaki et ál. (1999)	75%	-
Pajilla 0,25 mL (microvolumen)	Pugh et ál. (2000)	71%	32%
Hemi-pajilla	Vanderzwalmen et ál. (2000)	44%	-
Gel loading tips	Tominaga y Hanada (2005)	17%	-
Micropipeta de vidrio (GMP)	Vieira et ál. (2006)	75%	19%
Cryotop	De Rosa et ál. (2007)	75%	-
Micropipeta de vidrio (GMP)	Rios et ál. (2010)	61,30%	-
OPS sellada (CPS)	Yu et ál. (2010)	34,7%	

30.000°C/min. Varios autores demostraron esta eficacia, al alcanzar mayores tasas de congelación con micropipetas de vidrio (GMP) en comparación con las OPS, y mayores tasas de sobrevivencia *in vitro* posvitrificación. En el experimento realizado con embriones bovinos, por ejemplo, se obtuvieron 36/63 (57,1%)

de blastocitos eclosionados al ser vitrificados con las GMP en comparación a 28/54 (51,8%) con las OPS, debido a la mayor conductividad del empaque y la utilización de un menor volumen de crioprotectores (Kong et ál. 2000; Cho et ál. 2002) (figuras 1 y 2).

**FIGURAS 1 Y 2.** Comparación del diámetro interno entre la pajilla convencional (\varnothing di: 1,7 mm) OPS (\varnothing di: 0,8 mm) y GMP (\varnothing di: 0,3 mm)

Nitrógeno súpercongelado

Por último, otra de las estrategias para aumentar la velocidad de congelamiento ha sido la reducción de temperatura del nitrógeno líquido. El uso de nitrógeno súpercongelado (*slush* de nitrógeno, SN2) reduce el punto de ebullición, mediante la estabilización a través de la presión negativa, minimizando el efecto aislante del vapor del nitrógeno, lo cual permite mayor eficiencia en la transferencia de calor entre las muestras y el nitrógeno líquido (Vieira et ál. 2008). De esta forma, al evitar el revestimiento de las capas de nitrógeno durante la inmersión, el nitrógeno líquido puede alcanzar temperaturas hasta de -210°C, con curvas de congelamiento más rápidas (32.200°C/min), que reducen la posibilidad de recristalización (formación irregular de hielo intracelular), que se puede presentar en las muestras durante el descongelamiento, y la vitrificación de muestras más sensibles como en el caso de los oocitos humanos (Arav et ál. 2000; Santos et ál. 2006). Sobre este sistema, se han realizado varios trabajos que demuestran su efecto positivo, aun con el procedimiento de envases sellados, y se han alcanzado tasas de supervivencia *in vitro* superiores (56%) en comparación con las de un sistema de vitrificación convencional en nitrógeno líquido a -196°C (10%) ($p < 0,005$) (Yavin et ál., 2009).

Nuevas perspectivas

Es claro que la criopreservación de embriones *in vitro* está ligada a la calidad en el proceso de su producción. Por tanto, para poder generar métodos más eficientes de criopreservación se requiere no solo el desarrollo de nuevas tecnologías, sino igualmente modificaciones dentro

del proceso de producción que permitan una mayor sobrevivencia de los embriones en el momento de la vitrificación. La modificación de los medios de cultivo puede ser una de las opciones. El desarrollo de mejores sistemas de cultivo *in vitro*, eventualmente mejorará considerablemente la calidad embrionaria y, por tanto, la criotolerancia de los embriones. De forma que metodologías como el sistema de congelación convencional podrán ser igualmente utilizadas con éxito en la criopreservación de este tipo de embriones (Nedambale et ál. 2006). Diferentes estudios han demostrado que la producción de embriones *in vitro* en cierto tipo de medios de cultivo (Leibo y Loskutoff 1993; Mahmoudzadeh et ál. 1994; Massip et ál. 1995) o a través del cocultivo con células de la granulosa o células vero (Leibo y Loskutoff 1993; Desai et ál. 2000) pueden aumentar las tasas de sobrevivencia de los embriones posvitrificación.

El suero de origen animal utilizado en los medios de cultivo y la composición de lípidos en los sistemas de cultivo pueden cumplir el importante papel de la criotolerancia de los embriones. Se ha comprobado que la presencia del suero en el suplemento de los medios de cultivo puede influenciar la composición química de los embriones (Saha y Suzuki, 1997) y su sensibilidad a la criopreservación (Dinnyes et ál. 1995). Los medios de cultivo libres de suero permiten el desarrollo y la eclosión de casi el 100% de los embriones después de la vitrificación (Hochi et ál. 1996). De igual forma, el uso de etosulfato de fenazina (PES), permite mejorar las tasas de desarrollo embrionario con la reducción del contenido citoplasmático de lípidos en los embriones en el momento de la

vitrificación (Seidel 2006). La adición de la hialurona (Palasz et ál. 2008) o ácido linoleico (Hochi et ál. 1999; Laowtammathron et ál. 2005; Pereira y Marques 2008) también aumenta la criotolerancia de los embriones bovinos *in vitro*, cultivados en medios de cultivo libres de suero.

Por otro lado, se puede reducir igualmente el alto nivel de lípidos que se encuentra en los embriones producidos *in vitro*, por medio de la remoción de lípidos por centrifugación o a través de la micromanipulación por medio del desnudamiento por micropipeta o pipeteado intenso, con lo cual se aumentan las tasas de sobrevivencia de los embriones criopreservados.

Por su parte, la formación de radicales libres durante la criopreservación puede causar daño celular y disminuir la viabilidad de los embriones. Por esta razón, la adición de EDTA (0,1 mM) y/o glutation (GSH; 1 mM) en el cultivo antes de la vitrificación puede llegar a mejorar el desarrollo de los embriones, al disminuir la oxidación de las membranas celulares insaturadas de lípidos, promoviendo su integridad celular (Aksoy et ál. 1999). Además, la adición de agentes como el EDTA y el β - mercaptoetanol, pueden llegar a aumentar sustancialmente las tasas de sobrevivencia, aun en ambientes con bajos niveles de oxígeno, al proteger al embrión de los radicales libres y la autoperoxidación de lípidos (Nedambale et ál. 2006).

Otras estrategias de optimización del proceso de vitrificación pueden realizarse por medio de la modificación de las características propias del embrión antes de ser expuesto al proceso de criopreservación. Por ejemplo, la inyección de trealosa en oocitos aumenta la protec-

ción de las estructuras, principalmente en las membranas, y disminuye los efectos deletéreos debido a la toxicidad de los crioprotectores (Eroglu et ál. 2003). Por otra parte, la reducción artificial del fluido blastocélico, al modificar el volumen de líquido intracelular, consigue reducir el shock osmótico y los problemas de permeabilidad, así como la formación de cristales de hielo (Vanderzwalm et ál. 2002; Chen et ál. 2001; Son et ál. 2003). Por último, la utilización de estabilizadores del citoesqueleto con la adición de citocalasina B (Dobrinsky et ál. 2000) reduce la despolimerización de los microfilamentos y microtúbulos, y mejora las tasas de sobrevivencia de los oocitos y embriones criopreservados. Por lo tanto, todas estas metodologías serán probablemente útiles al minimizar ciertas anormalidades celulares propias de los embriones producidos *in vitro*, y hacer que cada vez sean menos sensibles a la vitrificación.

CONCLUSIÓN

La utilización de la vitrificación como método de criopreservación de embriones producidos *in vitro* ha abierto nuevas perspectivas en relación con la mejora de los sistemas de preservación o congelación de embriones y oocitos, ya que ha disminuido el riesgo de lesión del embrión producido por los métodos convencionales. Sin embargo, aún se necesitan varias modificaciones y mejoras en su metodología para que sea una herramienta aplicada ampliamente en el ámbito comercial.

REFERENCIAS

1. Agca Y, Monson R, Northey D, Schaefer D, Rutledge J. 1996. Postthaw pregnancy rates comparison of vitrified and frozen *in vitro*

- produced bovine embryos. *Theriogenology*. 45: 175.
2. Alvarenga MA, Fernandes CB, Landim-Alvarenga FC. 2007. Criopreservación de embriones equinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35(Supl 3): 799-809.
 3. Aksoy M, Takahashi Y, Hishinuma M, Elsheikh AS, Tanaka H, Kanagawa H. 1999. Influences of retrieval stages and glutathione addition on post-thaw viability of quick frozen mouse morula during *in vitro* culture. *Theriogenology*. 51(4): 681-687.
 4. Arav A. 1992. Vitrification of oocytes and embryos. In: Lauria A, Gandolfi F (ed), Embryonic development and manipulation in animal production. London and Chapel Hill: Portland Press. p. 255-264.
 5. Arav A, Zeron Y, Ocheretny A. 2000. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*. 53: 248.
 6. Baril G, Traldi AL, Cognié Y, Leboeuf B, Cbeckers, JF, Mermilliod P. 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*. 56(2): 299-305.
 7. Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod.* 27(1): 147-158.
 8. Bunn S, Bertolini M, Cruz FB, Martins LT, Gaudêncio Neto S, Wentz KC, et ál. 2006. Reduction in cryoprotectant concentrations on the vitrification of immature bovine oocytes, under a high cooling rate. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34 (Supplement 1): 309.
 9. Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reprod.* 16(11): 2350-2356.
 10. Cho SK, Cho SG, Bae IH, Park CS, Kong IK. 2002. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim Reprod Sci.* 73(3): 151-158.
 11. Cremades N, Sousa M, Silva J, Viana P, Sousa S, Oliveira C, et ál. 2004. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Human Reprod.* 19(2): 300-305.
 12. Cutaia LE, Bó GA. 2007. Cattle embryo production and trade in Argentina. *Acta Scient Vet.* 35(Supl 3): 931-944.
 13. De Rosa A, Attanasio L, Boccia L, Vecchio D, Campanile G, Gasparini B. 2007. Cryotop vitrification for *in vitro* produced bovine and buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos at different stages of development. *Italian Journal of Animal Science*. 6(2s).
 14. Desai N, Lawson J, Goldfarb J. 2000. Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cyopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. *Human Reprod.* 15: 410-418.
 15. Dinnyes A, Carolan C, Loneragan P, Solti L, Massip A, Mermilliod P. 1995. In vitro survival of IVF bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology*. 43(1): 197.
 16. Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000. High development rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 63: 513-518.
 17. Dinnyes A, Nedambale TL. 2009. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. *Reproduction. Fertility and Development*. 21(1): 45-59.
 18. Dobrinsky Jr. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*. 45(1): 17-26.
 19. Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod.* 62(3): 564-570.
 20. Duby, RT, Hill, JL, O'Callaghan D, Overstrom EW, Boland MP. 1997. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology*. 47(1): 332.

21. Eroglu A, Lawitts JA, Toner M, Toth TL. 2003. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology*. 46(2): 121-134.
22. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 21(4): 407-426.
23. Hamawaki A, Kuwayama M, Hamano S. 1999. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology*. 51: 165.
24. Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA et ál. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*. 43(1): 141-152.
25. He X, Park EYH, Fowler A, Yarmush ML, Toner M. 2008. Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: a study using murine embryonic stem cells. *Cryobiology*. 56(3): 223-232.
26. Hochi, S, Semple E, and Leibo SP. 1996. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology*. 46(5): 837-847.
27. Hochi S, Kimura K, Hanada A. 1999. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of *in vitro*-produced bovine morulae. *Theriogenology*. 52(3): 497-504.
28. Hredzak R, Ostró A, Zdilová V, Toporcerová S, Kacmárik J. 2005. Clinical experience with a modified method of human embryo vitrification. *Ceska Gynekol.* 70(2): 99-103.
29. Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 46(3): 205-229.
30. Isachenko V, Folch J, Isachenko E, Nawroth F, Krivokharchenko A, Vajta G, et ál. 2003. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology*. 60(3): 445-452.
31. Ishimori H, Takahashi Y, Kanagawa H. 1992. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Theriogenology*. 37(2): 481-487.
32. Iwasaki S, Yosiba N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in-vitro and in-vivo. *J. Reprod Fertil.* 90(1): 279-284.
33. Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I. 2001. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 65(4): 1127-1134.
34. Kasai M. 2002. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reprod Med Biol.* 1: 1-9.
35. Kasai M, Mukaida T. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online*. 9(2): 164-170.
36. Kong IK, Kong, Lee SI, Cho SG, Cho SK, Park CS. 2000. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*. 53(9): 1817-1826.
37. Kuwayama M, Vajta G, Leda S, Kato O. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 11(5): 608-614.
38. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol.* 17: 1234-1236.
39. Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, Hochi S, Parnpai R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology*. 64(5): 1185-1196.
40. Lazar L, Spak J, David V. 2000. The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*. 54: 571-578.
41. Lazzari G, Wrenzycki C, Herrmann D, Duuchi R, Kruip T, Niemann H et ál. 2002. Ce-

- llular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol Reprod.* 67(3): 767-775.
42. Leibo SP, Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology.* 39(1): 81-94.
43. Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Levy MJ. 2002. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reproductive Biomed Online.* 4(2): 146-150.
44. Liebermann J, Dietl J, Vanderzwalmen P, Tucker MJ. 2003. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? *Reprod Biomed Online.* 7(6): 623-633.
45. Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Moreira PM, Pintado B, de la Fuente J, Boland MP. 2003. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod.* 69(4): 1424-1431.
46. Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro*-produced cattle embryos. *Theriogenology.* 42: 1389-1397.
47. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod.* 54(5): 1059-1069.
48. Massip A, Van der zwalmen P, Hectors F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters.* 27: 270-273.
49. Massip A, Mermilliod P, Dinnyes A. 1995. Morphology and biochemistry of *in-vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum Reprod.* 10(11): 3004-3011.
50. Massip A. 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim.* 36:49-55.
51. Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology.* 42(2): 139-144.
52. Mezzalira A, Barbieri DP, Müller F, Pinho CC, Silva CAM, Rubin MIB, et ál. 1999. Vitrificação de oócitos bovinos em micropipetas de vidro. *Acta Scient Vet.* 27: 262.
53. Mezzalira A, Mezzalira JC, Moraes AN. 2004. Vitrification of bovine embryos: age of embryos and exposure time to cryoprotectant influences viability. *Arch of Vet Sci.* 9: 107-111.
54. Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryo-tolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology.* 65(8): 1551-1562.
55. Nedambale TL, Du F, Yang X, Tian XC. 2006. Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with β - mercaptoethanol. *Anim Reprod Sci.* 93(1-2): 61-75.
56. Niemann H, Wrenzycki C. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology.* 53(1): 21-34.
57. Palasz AT, Mapleton RJ. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances.* 14(2): 127-149.
58. Palasz, AT, Breña, PB, Martinez, MF, Perez-Garnelo SS, Ramirez MA, Gutiérrez-Adán A, De la Fuente J. 2008. Development, molecular composition and freeze tolerance of bovine embryos cultured in TCM-199 supplemented with hyaluronan. *Zygote.* 16(1): 39-47.
59. Pereira RM, Marques CC. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank.* 9(4): 267-277.
60. Pomar FJ, Teerds KJ, Kidson A, Colenbrander B, Tharasanan T, Aguilar B. 2005. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology.* 63(8): 2254-2268.

61. Pugh PA, Tervit HR, Niemann H. 2000. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw - dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Anim Repr Sci.* 58(1-2): 9-22.
62. Rall WF, Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature.* 313: 573-575.
63. Reinders JMC, Wurth YA, Kruip TAM. 1995. From embryo to a calf after embryo transfer, a comparison of in vivo and *in vitro* produced embryos. *Theriogenology.* 43: 306.
64. Rios GL, Mucci NC, Kaiser GG, Albeiro RH. 2010. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro*-produced bovine embryos. *Anm Repr Sci Animal reproduction science.* *Anim Repr Sci.* 118(1): 19-24.
65. Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P. 2002. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Mol Reprod Dev.* 62: 320-327.
66. Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Garnelo S, de la Fuente J, Boland MP, Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 68(1): 236-243.
67. Rodrigues, JL. 1996. Effect of pre-equilibration in 1.5 or 3.6 M Ethylene glycol on the survival of day-7 IVMFC bovine blastocysts vitrified in EFS solution. *Theriogenology.* 45: 168.
68. Santos RM, Barreta MH, Frajblat M, Córdovala Cucco D, Mezzalira JC, Bunn S et ál. 2006. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. *Ciéncia Rural.* 36: 1501-1506.
69. Saha S, Suzuki T. 1997. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos at different ages using one- and three-step addition of cryoprotective additives. *Reprod Fertil Dev.* 9(7): 741-746.
70. Seidel GE Jr. 1986. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. En: *Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings.* Fort Collins: Colorado State University-Animal Reproduction Laboratory. p. 6.
71. Seidel GE Jr. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology.* 65(1): 228-235.
72. Shamsuddin M, Larsson B, Gustaffson H, Gustari S, Bartolome J, Rodriguez-Martinez H. 1992. Comparative morphological evaluation of *in vitro* and *in vitro* produced bovine embryos. *International Congress on Animal Reproduction 3:* 1333-1335.
73. Son WY, Yoon SH, Yoon HJ, Lee SM, Lim JH. 2003. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod.* 18(1): 137-119.
74. Tominaga K, Hamada Y. 2001. Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. *J Reprod Develop.* 47: 267-273.
75. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, et ál. 2000. “*In vitro*” survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocyst after vitrification in an hemi-straw (HS) system. *Fertil Steril.* 74: 215-216.
76. Vajta G. 1997. Vitrification of bovine oocytes and embryos. *Embryo Transfer Newsletter.* 15(2): 12-18.
77. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et ál. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Develop.* 51(1): 53-58.
78. Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Repr Sci.* 60-61: 357-364.
79. Vajta G, Nagy ZP. 2006. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive Biomedicine Online.* 12(6): 779-796.
80. Vajta G, Kuwayama M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* 65(1): 236-224.
81. Van Soom A, Van Vlaenderen I, Mahmoudzadeh AR, Deluyker H, Kruif A. 1992. Com-

- paction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. Theriogenology. 38(5): 905-919.
82. Vanderzwalm P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, et ál. 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. Hum Reprod. 17(3): 744-751.
83. Viana JHM, Camargo LSA. 2007. Bovine embryo production in Brazil: a new scenario. Acta Scient. Vet. 35(Supl 3): 915-924.
84. Vieira AD, Forell F, Feltrin C, Rodrigues JL. 2008. Calves born after direct transfer of vitrified bovine *in vitro*-produced blastocysts derived from vitrified immature oocytes. Reprod Dom Anim. 43: 314-318.
85. Volkel SA, Hu YX. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology. 37(1): 23-37.
86. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. Cryobiology. 48(2): 146-156.
87. Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. 2009. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. Human Reproduction. 24(4): 797-804.
88. Yu XL, Deng W, Liu FJ, Li YH, Li XX, Zhang YL, Zan LS. 2010. Closed pulled straw vitrification of *in vitro*-produced and *in vivo*-produced bovine embryos. Theriogenology. 73(4): 474-479.
89. Zeron Y, Pearl M, Borochov A, Arav A. 1999. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. Cryobiology. 38(1): 35-42.