

Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos

Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation

M. CELESTINOS, M.V.Z.; R. GATICA, M.V., Ph.D.

Instituto de Reproducción Animal, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, CHILE

E-mail: mcelestinos@hotmail.com

SUMMARY

Over the last 40 years cells and embryos of mammals have been preserved, at room temperature, refrigeration temperature and by different cryoconservation methods. These techniques have evolved into more simple, practical and less expensive freezing procedures. One of these is vitrification, a process of solidification that uses a highly concentrated solution which does not crystallize during freezing; its viscosity increases with the descent of the temperature until the formation of an amorphous solid state similar to glass. For this reason, exposure and freezing rates should be quick enough to avoid toxicity and the formation of intracellular ice, which can cause embryonic damage. In order for the embryos to support the osmotic shock, they should be equilibrated with a less concentrated crioprotectant solution before being exposed to the vitrificant solution for their later freezing. Several vitrification procedures have been published about embryo preservation, using different crioprotectants, concentration, volume, addition method, temperatures, exposition time, freezing rate, thawing procedure and dilution, to maintain the function, normal structure and viability of the embryo. These techniques have also been experimented with in vitro and in vivo produced embryos, at different developmental stages. This paper aims to review the present bovine embryo cryopreservation methods, particularly vitrification, as well as to mention the latest procedures and progress so that new researchers may have an updated literature review to start their works.

Palabras claves: vitrificación, crioconservación, embriones.

Key words: vitrification, cryopreservation, embryos.

INTRODUCCION

El empleo de embriones congelados posibilita utilizar eficientemente donantes y receptoras; incorporar progreso genético a bajo costo, comparando los valores del embrión y el de su transporte frente a los animales en pie; transferir algunos embriones y conservar el resto hasta poder analizar los registros de producción de la descendencia; controlar enfermedades exóticas, reemplazando la importación de animales en pie por la de embriones congelados libres de ellas; crear bancos de embriones de valor pecuario, entre otras. Los registros de la

Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones revelan que más del 50% de 500.000 embriones de bovino transferidos en los últimos años han sido usados después de ser congelados y descongelados (Thiber, 1997).

Al conservar embriones a temperaturas extremadamente bajas (-196 °C en nitrógeno líquido) es posible detener casi por completo la actividad enzimática intercelular, respiración celular, metabolismo, crecimiento, multiplicación, etc.; es decir, reducir drásticamente la actividad fisiológica de la célula. Así es posible almacenar embriones durante un largo período sin afectar su viabilidad y sin causarles cambios genéticos (Schneider y Mazur, 1984; Gordon, 1994; Tanaka y col., 1997). Este hecho, convierte a la congelación de embriones en una herramienta

insustituible para el comercio internacional de reproductores.

La crioconservación de embriones considera, no sólo los estudios en relación a las técnicas y crioprotectores a usar para obtener altas tasas de sobrevivencia embrionaria. También estudia los cambios celulares ocurridos durante estos procesos, lo que está revisado por Dobrinsky (1996).

En la actualidad, la crioconservación de embriones de mamíferos ha llegado a ser un procedimiento rutinario en biología, ganadería y medicina, pudiendo lograrse por procedimientos de congelación estándar y por vitrificación. La principal diferencia que tiene la vitrificación con el método estándar es que en este último la concentración de crioprotectores es menor y el descenso de temperatura se realiza de manera controlada mediante equipos programables (Fahning y García, 1992). A pesar de los beneficios prácticos, ventajas económicas y buenos resultados que se han obtenido experimentalmente, la vitrificación no se ha utilizado masivamente debido a la falta de estandarización de los protocolos. De ahí el motivo del presente trabajo, que pretende dar una visión general de los métodos de conservación y en particular de la vitrificación de embriones bovinos, así como de mencionar los últimos avances y procedimientos para tener una buena base bibliográfica a partir de la cual emprender las diferentes investigaciones.

CRIOPROTECTORES

Los embriones, al ser congelados, necesitan ser deshidratados parcialmente a fin de evitar la formación de cristales que lesionan las estructuras citoplasmáticas (Mazur, 1984). Esta deshidratación se logra incorporando un agente crioprotector al medio de congelación. En la congelación de embriones se utilizan dos tipos de crioprotectores:

PERMEABLES O INTRACELULARES: De bajo peso molecular, Glicerol (G), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1-2 propanodiol, etilenglicol (EG), propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG),

etanol y otros alcoholes; todos estos compuestos deshidratan la célula penetrando a ésta para ayudar a proteger el citoplasma (Miyake y col., 1993).

IMPERMEABLES O EXTRACELULARES: De alto peso molecular, polivinilpirrolidona (PVP), glucosa, fructosa, ficol, dextrano sorbitol, sucrosa, lactosa, trealosa, rafinosa y otros azúcares (Kuleshova y col., 1999), estos compuestos extraen el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula; son efectivos para preservar la funcionalidad y estructura de las membranas a baja actividad de agua; deshidratan junto con el crioprotector las células de los embriones durante el equilibrio (Sommerfeld y Nieman, 1999).

Los crioprotectores previenen la deshidratación total y la degeneración proteica, causada por la congelación del agua intra y extracelular durante el proceso. Además, no deben ser tóxicos a los embriones. Para reducir el daño osmótico y tóxico del crioprotector, debido a la alta concentración de sales, se ha dejado de utilizar G y DMSO para hacer uso de EG, solo o en combinación con sucrosa o trealosa que ha demostrado ser menos tóxico (Dochi y col., 1990; Leeuw y col., 1994). Dado su bajo peso molecular, el EG tendría una mayor velocidad de penetración y, por ende, necesitaría menor tiempo de exposición, disminuyendo su efecto tóxico (Saha y col., 1996).

Se ha demostrado lo importante que es el estado de desarrollo embrionario en la velocidad de penetración del crioprotector. Leibo (1977) demostró que la permeabilidad de los embriones a los crioprotectores se incrementa luego de la fecundación, aumentando a medida que el desarrollo embrionario progresa. Esto se debería a la diferencia que existe en la relación área/volumen en un embrión en los primeros estadios del desarrollo.

La etapa del desarrollo más apropiada para la vitrificación en etilenglicol es la mórula compacta y blastocisto temprano de embriones producidos *in vivo* o *in vitro* (Cocero y col., 2000), así como también se ha demostrado que

embriones producidos *in vitro* tienen menor tolerancia a la congelación debido a la formación de hielo intracelular, aumento en la concentración de lípidos y enzimas que digieren la zona pelúcida, lo que los hace más sensibles al enfriamiento y a la invasión de virus, bacterias y hongos (Saha y col., 1995; Semple y col., 1995; Kobayasi y col., 1994; Le Gal y Massip, 1999; Dattena y col., 2000). Otro aspecto a considerar es la calidad de los embriones a vitrificar, ya que cuando se congelan embriones de buena calidad, se obtienen mejores resultados que cuando se congelan aquellos de calidad regular (Humbolt y col., 1987).

Está claro que la congelabilidad de los embriones mamíferos varía con la especie del animal. Esta diferencia de especie está claramente establecida entre embriones bovinos, porcinos y equinos. Sin embargo trabajos recientes demuestran que embriones de bovinos, ovinos, ratones y conejos tienen un comportamiento similar a la congelabilidad (Hasler y col., 1995; Sommerfeld y Niemann, 1999; Saha y col., 1996).

CONSERVACION DE EMBRIONES

Los embriones pueden ser conservados, *in vitro*, para su posterior transferencia mediante: Cultivo a temperatura ambiente, refrigeración entre 0 °C a + 4 °C ó congelación a -196 °C.

CONSERVACION A TEMPERATURA AMBIENTE. Un paso indispensable en la transferencia de embriones es la conservación temporal de embriones recobrados de una donadora antes de ser transferidos o congelados, ésta se realiza en un medio de Solución Buffer Fosfato (PBS), suplementado con 10% suero, una fuente de proteínas que reduce la tensión superficial favorece la sedimentación, evita que los embriones se adhieran a algún elemento utilizado para su manipulación, incorpora sustancias promotoras del crecimiento que favorecen su desarrollo, absorbe e inhibe metales pesados tóxicos que puedan estar presentes en el medio. La viabilidad embrionaria declina después de 12 horas (Palma y Brem, 1993).

REFRIGERACION. Ha quedado claro que embriones de bovinos mantenidos en un medio no nutritivo por un largo tiempo y a temperatura ambiente decrecen ampliamente su capacidad de desarrollo, este desarrollo puede ser preservado si los embriones se refrigeran de 0 a 4 °C por no más de 24 horas (Refsdal y col., 1988).

La refrigeración se efectúa vehiculizando los embriones en PBS envasados en pajuelas de 0.25 ml y colocadas en un refrigerador. Se utiliza hielo y agua para regular el descenso de la temperatura, de manera similar a como se realiza la estabilización del semen (Landsverk y col. 1992). La refrigeración de embriones puede ser considerada como una alternativa interesante cuando no sea posible recurrir a la congelación.

CONGELACION ESTANDAR. El método de congelación estándar posibilitó a Wilmut y Rowson (1973) obtener el primer ternero nacido de la transferencia de un embrión congelado. Al método estándar se le han efectuado desde entonces distintas modificaciones tendientes a su simplificación.

En el método de congelación estándar la exposición de los embriones al medio de congelación (PBS + G) debe realizarse a temperatura ambiente (20 - 22 °C), en un solo paso, de 10 a 30 minutos de duración (Chupin y Procureur, 1984; Niemann, 1991). Este período incluye el envasado de los embriones en pajuelas plásticas. Esto permite realizar más rápidamente y con mayor precisión la inducción de la cristalización o "seeding" (Maurer, 1978). Las pajuelas deben ser colocadas en un equipo de congelación a -7 °C durante 5 minutos para equilibrar la temperatura de las pajuelas con la del equipo; el seeding se realiza poniendo en contacto la superficie de la pajuela con una placa metálica enfriada con nitrógeno líquido (NL₂); el agente refrigerante del equipo puede ser nitrógeno líquido alcohol o etanol enfriado por medio de un compresor.

El no inducir la cristalización conduce a la formación de cristales de hielo bajo un estado de súperenfriamiento y a una elevación repentina de temperatura (se genera calor latente de -10° - -15 °C), resultando un severo trauma físico que puede dañar las células (Niemann, 1995).

Una vez efectuado el seeding, se mantiene la temperatura estable durante 10 minutos (período de estabilización) y luego se desciende a una velocidad de entre 0.1 y 0.5 °C hasta -30 ó -35 °C para establecer un adecuado balance entre deshidratación y formación de hielo intracelular, en este momento las pajuelas pueden ser retiradas del equipo de congelación y sumergidas en nitrógeno líquido (Lehnjensen y Greve, 1982). La descongelación se realiza de manera rápida, sumergiendo las pajuelas en baño María a 30 ó 35 °C durante 20–30 segundos.

CONGELACION RAPIDA. Método desarrollado por Chupin (1986). Los embriones son deshidratados parcialmente como ocurre en el método estándar, luego se les deshidrata nuevamente colocándolos en una solución mixta de glicerol y sucrosa. Esta segunda deshidratación deja a los embriones en condiciones de ser enfriados rápidamente. Las pajuelas son colocadas en el cuello del termo de nitrógeno, durante 5 minutos, posteriormente son sumergidas al NL. Los resultados obtenidos fueron dispares, según el estadio de desarrollo del embrión congelado. Martino y col. (1996) realizaron modificaciones, congelando ovocitos en gradillas de microscopio electrónico con 1 µl de EG sumergiéndolas inmediatamente en NL. Obteniendo tasas de sobrevivencia semejantes a los de ovocitos expuestos al EG, pero sin congelamiento.

VITRIFICACION. La vitrificación es un proceso físico de solidificación utilizado para conservar órganos, tejidos y embriones. La solución vitrificante (SV) lleva incorporado crioprotectores en alta concentración. Al ser enfriada no cristaliza, sino que se torna viscosa y pasa del estado líquido a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, tomando de ahí su nombre. Todo el procedimiento desde el equilibrio hasta la inmersión en NL no requiere más de 10 minutos (Fahy y col., 1984; Rall y Fahy, 1985).

Durante el proceso de vitrificación, el embrión esta sometido a deshidratación durante el enfriamiento e hidratación durante el

descongelamiento. Esto se debería a que a medida que desciende la temperatura, se va formando mayor número de cristales de hielo provenientes de agua pura intracelular, y así la concentración del soluto va aumentando en los espacios que aún no se congelan. Este choque osmótico es conocido como “efecto solución”, y puede llegar a ser dañino para la sobrevivencia del embrión (Scheider y Mazur, 1984), debido a la pérdida del equilibrio de las soluciones intra y extracelulares, respuestas químicas y osmóticas de las células a dichos efectos.

Para obtener buenos resultados se deben tomar en cuenta los siguientes factores: volumen de la muestra, concentración de crioprotector, método de adición, temperatura y tiempo de equilibrio, solidificación, tasa de enfriamiento y cambios en el volumen (Arav y col., 2000), debido a que estos factores están estrechamente relacionados con la permeabilidad y la toxicidad del crioprotector (Miyake y col., 1993).

El máximo daño en el embrión durante el enfriamiento ocurre de -15 a -16 °C debido a la fase de transición de la membrana lipídica. Esta fase se ve afectada por la fusión de los liposomas afectando el termocomportamiento de las membranas en la transición de líquido a gel (Zeron y col., 2000) y la velocidad de penetración de los crioprotectores (Thompson, 1997; Pugh y col., 2000). El daño celular incluye pérdida de microvellosidades, disrupción de la membrana plasmática, cambios mitocondriales, hinchamiento del retículo endoplásmico, pérdida de uniones entre células así como fractura de zona pelúcida (Edashige y col, 1999; Ohboshi y col., 1998).

TECNICAS DE VITRIFICACION. Antes de la vitrificación, los embriones deben ser equilibrados con el crioprotector a temperatura ambiente. La metodología descrita por Sheffen y col. (1986) indica que la exposición a la solución de equilibrio (SE) (10% G + 20% PG en PBS) debe realizarse a temperatura ambiente (20 °C), durante 10 minutos y la exposición a la SV (25% G + 25% PG) a 4 °C. Dobrinsky y col. (1991) deshidrataron al embrión en SE (10% G y 25% PG) por 7 minutos a 20 °C, pasando a

SV (25% G y 25% PG) manteniendo la misma temperatura hasta introducirlo al NL.

Dochi y col. (1990) y Kasai (1996) equilibraron mórulas y blastocistos bovinos (10% G + 20% 1-2 Propanodiol) durante 10 minutos, luego los expusieron a SV (25% G + 25% 1-2 Propanodiol + sucrosa 1M en PBS), inmediatamente después de cerrada, la pajuela se introdujo lenta y progresivamente en el nitrógeno para que se produzca simultáneamente la vitrificación de los compartimentos extra e intracelulares, lo que posibilitó transferir los embriones a campo. Utilizando estas soluciones se obtuvo porcentajes de preñez del 50%, demostrando que son soluciones estables con poca tendencia a cristalizar durante el enfriamiento.

Sommerfeld y Niemann (1999) vitrificaron embriones bovinos producidos *in vitro* (IVP) con EG 1.5 – 1.8 M, teniendo porcentajes de desarrollo del 42%. Dochi y col. (1995) utilizaron 40% EG, 20% PVP y 11,3% trealosa, para determinar la toxicidad de la vitrificación con relación a la temperatura y tiempo de exposición. El tratamiento fue llevado a cabo a 20 °C, durante 5 minutos, en PBS, obteniendo tasas de desarrollo del 84%.

Rall y Fahy (1985) y Massip y col. (1987) vitrificaron embriones de ratón de 8 células, éstos se equilibraron progresivamente a 4 °C, con DMSO 20.5%, acetamida 15.5%, PG 10% y PEG 6% en PBS Dulbecco modificado, luego se sumergieron en NL. Los embriones sobrevivieron después de ser cultivados *in vitro* y se obtuvieron nacimientos vivos en un 39.1%.

Vajta y col. (1996a) equilibraron embriones de 7 días en SV al 50% (12.5% EG y 12.5% DMSO + 75% PBS) a temperatura ambiente durante 5 minutos, fueron transferidos a SV al 100% (25% EG y 25% DMSO) a 4 °C durante 20 segundos y posteriormente sumergidos en nitrógeno, obteniendo altas tasas de preñez con blastocistos tempranos. Dhali y col. (2000) utilizaron una combinación de EG 3.5M y DMSO 3.4M con un tiempo de equilibrio de 3 minutos obteniendo tasas de desarrollo del 69%. Yang y col. (2000) probaron la adición de PVP (10%) y Trealosa (0.3M) obteniendo porcentajes

de preñez del 50% en embriones producidos *in vitro* y 55% en embriones producidos *in vivo*.

La técnica descrita por Vajta y col. (1996a) ha sido usada para vitrificar embriones posterior a la biopsia, para un eventual uso en el sexaje de embriones (Vajta y col., 1996b; Vajta y col., 1997a), sin afectar el desarrollo hasta blastocisto sobre los controles. La misma técnica se ha usado también para vitrificar embriones posterior a una eclosión asistida de los blastocistos (Vajta y col., 1997b) sin afectar el desarrollo posterior sobre los controles.

Saito (1994), Saito e Imai (1997), Donnay y col. (1998) vitrificaron blastocistos de bovinos en tres pasos 1) 5 minutos (Sucrosa 0.1M, Xilosa 0.1M, PG 1%, G 10%,.); 2) 5 minutos (Sucrosa 0.1M, Xilosa 0.1M, PG 1%, Glicerol 10%, EG 10%) 3) 1 minuto (Sucrosa 0.1M, Xilosa 0.1M, PG 1%, G 10%, EG 20%), en Dulbecco-PBS a temperatura ambiente y posteriormente sumergidos en NL. Obteniendo tasas de desarrollo del 72%, 88,9% y 71% respectivamente. Kaidi y col. (2000), López y López (2000) utilizaron la misma técnica empleando embriones de ovinos y conejos, mejorando los resultados antes mencionados. Este método, en dos pasos, había sido descrito por Sheffen y col. (1986) en embriones de ratón, obteniendo resultados similares a los de sus colegas, más no así Viscarra (1996).

La descongelación puede realizarse exponiendo las pajuelas a temperatura ambiente durante 10 segundos antes de colocarlas en baño María 30-35 °C, 20-30 segundos (Rall y Meyer, 1986). En ésta debe estar presente un agente permeable extracelular como la albúmina sérica bovina (BSA) que proteja y estabilice las membranas celulares para que no se detenga el transporte de agua a través de éstas, evitando que la célula sufra lisis durante la difusión del crioprotector y daño en la capa trofoblástica (Saha y col., 1996; Massip y col., 1987).

Los crioprotectores pueden ser removidos de los embriones en tres y seis pasos en forma escalonada, hasta lograr una concentración final de PBS sin crioprotector. Saito (1994) utilizó dos pasos sucrosa 0.5M. y 0.25M, manteniendo al embrión durante cinco minutos en cada una. El embrión

también puede transferirse en forma directa. Leibo (1984) desarrolló técnicas que permiten extraer el glicerol dentro de la pajuela, modificación conocida como “método de un solo paso en pajuela”, donde la variación radica en la disposición de las distintas soluciones (0.24M sucrosa, 1.4M G con el embrión y 0.25M sucrosa en PBS divididas las soluciones por columnas de aire).

Esta técnica permite transferir embriones congelados a campo sin necesidad de equipos y laboratorios muy costosos, obteniendo tasas de preñez que oscilan entre el 30 y el 50 %. Cuando el glicerol es extraído dentro de la pajuela, los porcentajes de preñez se pueden ver afectados por prescindir de la evaluación morfológica (Niemann, 1991).

En los últimos trabajos realizados en vitrificación se ha intentado reducir al máximo el daño celular, por los crioprotectores, su concentración y su volumen. Esto llevó a Vajta y col. (1997c, 1998) a ensayar una técnica de vitrificación denominada OPS (Open Pulled Straw) que consiste en adelgazar una pajuela plástica de 0.25 ml, calentándola sobre una platina y estirándola en su parte central hasta que su diámetro interior llegue a 0.7- 0.8 mm. Luego de enfriada la pajuela es cortada en su parte más delgada. El embrión es recogido por la parte más fina de la pajuela mediante capilaridad y luego esta es inmediatamente sumergida en NL. Embriones de 8 días sobrevivieron al cultivo en un 81% utilizando este método.

Kong y col. (2000) vitrificaron en una ultra mini pajilla (1.0 – 0.8 mm de diámetro) para reducir el daño por el alto volumen de la SV, obteniendo tasas de desarrollo a la descongelación y cultivo del 72%.

Recientemente se ha ensayado el uso de diferentes tipos de contenedores para vitrificación de embriones, como son las gradillas de cobre para microscopio electrónico (Martino y col., 1996) y las mallas de nylon (Matsumoto y col., 2001). En estos contenedores se logró vitrificar de 15 a 65 embriones a la vez. Los resultados obtenidos utilizando estas técnicas de vitrificación fueron similares a sus controles y ofrecen una nueva alternativa para criopreservar gran número de embriones.

CONCLUSIONES

El resultado de la vitrificación está condicionado previamente por dos factores. La calidad del embrión y el estado de desarrollo embrionario. Cuando se congelan embriones de calidades muy buena y buena se obtienen mejores resultados que cuando se congelan aquellos de calidad regular. La etapa del desarrollo más apropiada para la vitrificación de embriones es mórula compacta a blastocisto expandido, siendo más sensibles a las bajas temperaturas los embriones producidos *in vitro*.

Para elegir el mejor método de vitrificación se deben tomar en cuenta diferentes factores como son los siguientes: crioprotectores a utilizar, estos deben manejarse en adecuada concentración, adicionarse al embrión en forma creciente y a tiempos determinados, en combinación con otros crioprotectores que sean de baja toxicidad, para que sean utilizados con el menor volumen posible, temperatura de adición y con tasas de enfriamiento lo suficientemente rápidas para evitar la pérdida del equilibrio osmótico y causar daño celular que comprometa la viabilidad embrionaria.

RESUMEN

Desde hace más de 40 años se han conservado células y embriones de mamíferos, a temperatura ambiente, en refrigeración y por los diferentes métodos de crioconservación. Estas técnicas han ido evolucionando en procedimientos de congelación más simples, prácticos y menos costosos, uno es la vitrificación de embriones, proceso de solidificación, en el cual se utiliza una solución altamente concentrada que no cristaliza durante el congelamiento, en tanto que su viscosidad aumenta con el descenso de temperatura hasta la formación de un estado sólido amorfo semejante al vidrio. Por esto, la exposición y las tasas de congelamiento deben ser lo suficientemente rápidas para evitar la toxicidad y la formación de cristales intracelulares que puedan dañar al embrión. Para que los embriones soporten el choque osmótico, deben equilibrarse

con una solución crioprotectora de menor concentración antes de exponerse a la solución vitrificante para su posterior congelación. Se ha publicado gran cantidad de técnicas de vitrificación para embriones, utilizando diferentes crioprotectores, concentración, volumen, método de adición, temperaturas, tiempo de exposición, tasa de congelación, descongelación y dilución, para mantener la función, estructura normal y viabilidad del embrión. Estas técnicas también se han experimentado en embriones producidos *in vitro* como *in vivo* y en diferentes etapas de desarrollo. El presente trabajo pretende dar una visión general de los métodos de conservación y en particular de la vitrificación de embriones bovinos, así como mencionar los últimos avances y procedimientos para tener una buena base bibliográfica a partir de la cual emprender las diferentes investigaciones.

BIBLIOGRAFIA

- ARAV, A., Y. ZERON, A. OCHERENTY. 2000. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology* 53: 247. Abst.
- COCERO, M. J., S. MORENO, B. AGUILAR. 2000. Ultrastructure of *in vivo*-produced sheep embryos after cryopreservation in glycerol or ethylene glycol. *Theriogenology* 53: 250. Abst.
- CHUPIN, D., R. PROCUREUR. 1984. Glycerol equilibration for deep freezing of cattle blastocysts: Effect of number of steps and of total duration. *Theriogenology* 21: 230. Abst.
- CHUPIN, D. 1986. Quick freezing of bovine blastocysts. *Theriogenology* 25: 219. Abst.
- DATTENA, M., G. PTAK, P. LOI, P. CAPPAL. 2000. Lambing rate following transfer after vitrification of *in vitro* and *in vivo* produced ovine embryos. *Theriogenology* 53: 252. Abst.
- DHALI, A., R. S. MANIK, S. K. DAS, S. K. SINGLA, P. PALTA. 2000. Effect of ethylene glycol concentration and exposure time on post vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo oocytes. *Theriogenology* 53: 253. Abst.
- DOBRINSKY, J. R., F.F. HESS, R. T. DUBY, J. M. ROBL. 1991. Cryopreservation of bovine embryos by vitrification. *Theriogenology* 37: 20. Abst.
- DOBRINSKY, J. R. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45: 17-26.
- DOCHI, O., H. TAKAKURA, K. IMAI. 1990. Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrification. *Japanese J. of Anim. Repr.* 36: 69-72.
- DOCHI, O., K. IMAI, H. TAKANURA. 1995. Birth of calves after direct transfer thawed bovine embryos. Stored frozen in ethylene glycol. *Anim. Repr. Sci.* 38: 179-185.
- DONNAY, I., P. AUQUIER, S. KAIDI, C. CAROLAN, P. LONERGAN, P. MERMILLOD, A. MASSIP. 1998. Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Anim. Repr. Sci.* 52: 93-104.
- EDASHIGE, K., A. ASANO, T. A. ZHU, M. KASAI. 1999. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology* 38: 273-280.
- FAHNING, M. L., M. A. GARCÍA. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 29: 1-18.
- FAHY, G., D. MAC FARLENE, C. ANGELL, H. MERYMAN. 1984. Vitrification as an approach to cryoconservation. *Cryobiology* 21: 407-426.
- GORDON, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. *Ed. Cab Internacional*. UK.
- HASLER, J. F., W. B. HENDRESON, P. J. HURTGEN, Z. Q. JIN, A. D. MCCAULEY and S. A. TRIMER. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141-152.
- HUMBOLT, P., J. PERRIN, N. JEANGUYOT, M. NIBART, M. THIBER. 1987. Effects of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology* 27: 240.
- KAIDI, S., I. DONNAY, F. DESSY, A. MASSIP. 2000. Effect of freezing or vitrification on the quality of *in vitro* - produced bovine blastocysts. *Theriogenology* 53: 266.
- KASAI, M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Repr. Sci.* 42: 67-75.
- KOBAYASI, S., M. TOMITA, J. W. POLLARD, S. P. LEIBO. 1994. Survival of cryopreserved porcine embryos vitrified in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Theriogenology* 41: 228.
- KONG, I. K. S. I. LEE, Y. T. IM, S. G. CHO, H. J. OHH, I. H. BAE. 2000. Improvement of post-thaw hatching rates of *in vitro*-produced bovine embryos vitrified by ultra-mini straw. *Theriogenology* 53: 258.
- KULESHOVA, L. L., D. R. MAC FARLENE, A. O. TROUNSON, J. N. SHAW. 1999. Sugars exert a

- major influence on the vitrification properties of ethylene glycol – based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 38: 119-130.
- LANDSVERK, K., U. JAAKMA, I. MUURSEPP, A. O. REFSDAL, E. VALDEMANN. 1992. A field experiment comparing pregnancy rates in the bovine after transfer of embryos stored at 4°C and frozen-thawed embryos. Proceedings of the 12th International Congress on Anim. Repr. The Hague 3: 1448-1450.
- LEEJW, A. M., W. J. H. DAAS, W. F. RALL. 1994. Pregnancy rates in a comparative field trial of vitrification and one-step dilution or conventional slow freezing and three-step dilution of bovine embryos are similar. *Theriogenology* 41: 326.
- LE GAL, F., A. MASSIP. 1999. Cryopreservation of cattle oocytes: Effects of meiotic stage, cyclohexamide treatment, and vitrification procedure. *Cryobiology* 38: 290-300.
- LEHNJENSEN, H., T. GREVE. 1982. The survival of cow blastocysts frozen in 1,4M glycerol after plunging between -15 and -60 and rapid thawing. *Theriogenology* 17: 95
- LEIBO, S. 1977. In: The freezing of mammalian embryos. K. Elliott and J. Whelan, (eds.), CIBA Foundation Symposium. Elsevier/Excerpta Medica. pp. 125-127.
- LEIBO, S. 1984. A one step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21: 767-790.
- LÓPEZ, M. B., F. G. LÓPEZ. 2000. In vitro and in vivo survival of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology* 53: 259.
- MARTINO, A., N. SONGSASEN, S.P. LEIBO. 1996. Development into Blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra rapid cooling. *Biology of Reproduction* 45: 1059-1069.
- MASSIP, A., P. VAN DER ZWALMEN, F. HECTOR. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters* 7: 270-273.
- MATSUMOTO, H., J.Y. JIANG, T. TANAKA, H. SASADA, E. SATO. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 42: 139-144.
- MAURER, R. 1978. Freezing of mammalian embryos: A review of the techniques. *Theriogenology* 9: 45-68.
- MAZUR, P. 1984. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. *Anim. Repr. Sci.* 28: 239-245.
- MIYAKE, T., M. KASAI, S. E. ZHU, T. SAKURAI, T. MACHIDA. 1993. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene based solution by a simple method. *Theriogenology* 40: 121-134.
- NIEMANN, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology* 35: 109-124
- NIEMANN, H. 1995. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived *in vitro* and *in vivo*. In: Enne, G., G. F. Greppi, A. Lauria. (eds.). Reproduction and Animal Breeding, Advances and Strategy. Elsevier, Amsterdam. pp. 117-128.
- OHBOSHI, S., N. FUJIHARA, T. YOSHIDA, H. TOMAGANE. 1998. Ultrastructure of bovine in vitro-produced blastocysts cryopreserved by vitrification. *Zygote* 6:17.
- PALMA, G. A., G. BREM. 1993. Transferencia de embriones y biotecnología de la reproducción en la especie bovina. Hemisferio Sur. Argentina.
- PUGH, P. A., H. R. TERVIT, H. NIEMANN. 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: 9-22.
- RALL, W. F., G. M. FAHY. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573- 575.
- RALL, W. F., T. K. MEYER. 1986. Fracture damage to zona of mammalian embryos cryopreservation and its avoidance. *Cryobiology* 23: 557-558.
- REFSDAL, A. H. KJAESTAD, T. VATN. 1988. Transfer of refrigerated bovine embryos. Proceedings 11th International Congress on Anim. Prod. and AI. Dublin Ireland. Vol. 2: 186.
- SAHA, S., R. RAJAMAHENDRAN, A. CECE, T. SUZUKI. 1995. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture following vitrification and one – step rehydration. *Theriogenology* 43: 311.
- SAHA, S., T. OTOI, M. TAKAGI, A. BOEDIONO, C. SUMANTRI, T. SUZUKI. 1996. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trealose and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33: 291-299.
- SAITO, N. 1994. Manual of embryo transfer and *in vitro* fertilization in cattle. National livestock Breeding Center. Japan. pp: 75-80.
- SAITO, N., K. IMAI. 1997. The effect of addition of various monosaccharides to vitrification solution on the survival of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Cryobiology and Cryotechnology* 43: 34-39.
- SCHNEIDER, U., P. MAZUR. 1984. Osmotic

- consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen – thawed embryos. *Theriogenology* 21: 68-79.
- SEMPLER, M. E., K.J. BETTERIDGE, S. P. LEIBO. 1995. Cryopreservation of *in vitro* derived bovine embryos produced in a serum – free culture system. *Theriogenology* 43: 320.
- SHEFFEN, B., P. VAN DER ZWALMEN, A. MASSIP. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo – Lett.* 7: 260-269.
- SOMMERFELD, V., H. NIEMANN, 1999. Cryopreservation of bovine *in vitro* Produced Embryos Using Ethylenglicol in Controlled Freezing or Vitrification. *Cryobiology* 38: 95-105.
- TANAKA, H., P. BALLARALE, J. MASAKI, H. KANAGAWA. 1997. Teoría y Practica de la fecundación *in vitro*. Capitulo V. JICA. Chile.
- THIBER, M. 1997. The Internacional Embryo Transfer Society. Word Statics of Embryo Transfer: The 1996 Report. *Embryo Transfer Newslett* 15: 10-13.
- THOMPSON, J. G. 1997. Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod. Fertil. Dev.* 9: 341-354.
- VAJTA, G., P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1996a. Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct *in straw* rehydration. *Anim. Repr. Sci.* 45: 191-200.
- VAJTA, G., P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1996b. Cumulative efficiency of biopsy, vitrification and *in straw* dilution in a bovine *in vitro* embryo production system. *Theriogenology* 45: 162. Abst.
- VAJTA, G., P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1997a. Comparison of two manipulation methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 47: 501-509.
- VAJTA, G., P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1997b. Survival and development of bovine blastocysts produced *in vitro* after assisted hatching, vitrification and *in-straw* direct rehydration. *Theriogenology* 111: 65-70.
- VAJTA, G., P.J. BOOTH, P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1997c. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters* 18: 191-195.
- VAJTA, G., P. HOLM, M. KUWAYAMA, P.J. BOOTH, H. JACOBSEN, T. GREVE, H. CALLESEN. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molec. Reprod. and Dev.* 51: 53-58.
- VISCARRA, T. R. 1996. Evaluación de la técnica de vitrificación, como método de crioconservación en embriones de ratón al estado de mórula y blastocisto temprano. Tesis, M.V., Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias; Valdivia, Chile.
- WILMUT, I., L. ROWSON. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92: 686-690.
- YANG, B. C., H. H. SEONG, G. S. IM, S. J. PARK, W. K. CHANG, I. C. CHEONG. 2000. Effects of vitrification methods and polyvinylpyrrolidone supplementation on the viability of immature bovine oocytes. *Theriogenology* 53: 266.
- ZERON, Y., M. TOMCZAK, J. CROWE, A. ARAV. 2000. Electrofusion of bovine oocytes with different liposomes changes the membrane thermobehavior and reduces chilling sensitivity. *Theriogenology* 53: 267.

