

Vitrificación de blastocitos bovinos producidos *in vitro* con el método Open Pulled Straw (OPS): Primer reporte*

Sucesfull vitrification with the Open Pulled Straw method (OPS) of bovine blastocysts produced *in vitro*: Preliminary results

M. E. SILVA¹, M. V., Mg. Cs.; M. A. BERLAND², Biol., Mg. Cs.

Clínica de Animales Mayores¹, Laboratorio de Reproducción Animal², Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco, Casilla 15-D, Temuco. e-mail: masilva@uct.cl

SUMMARY

The purpose of this work is to present preliminary results of succesfull vitrification of bovine embryos produced *in vitro* using the Open Pulled Straw (OPS) method.

Open Pulled Straws were made by pulling 0.25 ml French mini straws which were heat-softened until their inner and outer diameter were reduced to half of their original dimensions. Ninetythree blastocyst were selected and deposited individually in vitrification solutions 1 and 2 containing TCM199 (20% BFS), ethylene glycol and dimethyl – sulfoxide (DMSO), for 1 minute and 20 seconds respectively. During the last period a drop of 2 µl containing the embryo pulled into the straw by capillarity effect. Immediately after that all straws were deposited into liquid Nitrogen.

Eighty three blastocysts were recovered after thawing. Fifty four percent of these were re- expanded or hatched after 24 hours of *in vitro* culture. After 72 hours of *in vitro* culture 29% of the blastocysts matured. Even though our results are slightly lower to those reported in the literature, they show that it is possible to successfully vitrify bovine blastocysts produced *in vitro* using the OPS method.

Palabras claves: embriones bovinos, *in vitro*, vitrificación, Open Pulled Straw.

Key words: bovine embryos, *in vitro*, vitrification, Open Pulled Straw.

INTRODUCCION

La vitrificación exitosa de embriones mamíferos, específicamente en ratones, fue descrita por primera vez por Rall y Fahy (1985). La vitrificación es un método de criopreservación extremadamente rápido, en el cual los embriones son incluidos en soluciones altamente concentradas de crioprotectores y sumergidos directamente en el nitrógeno líquido, desde una temperatura superior a los 0°C, demorándose así sólo unos segundos en

congelarse (Kasai, 1997). De esta manera se logra la solidificación de la solución crioprotectora al tomar contacto con el nitrógeno líquido, producto del aumento extremo de su viscosidad, que sin embargo, no involucra la formación de cristales de hielo (Fahy y col., 1984).

A partir del primer reporte, la vitrificación ha sido utilizada exitosamente como método de congelación de ovocitos y embriones de diversas especies, entre las que se pueden señalar: roedores (Kasai y col., 1990), ovinos (Schiewe y col., 1991), caprinos (Yuswiati y Holtz, 1990), porcinos (Vatja y col., 1997a), bovinos (Vatja y col., 1997b, Vatja y col., 1997c), Murinos (Kasai y col., 1992), equinos (Oberstein y col., 2001) y humanos (Mukaida y col., 1998).

Aceptado: 13.04.2004.

* Financiado por la Dirección de Investigación y Postgrado de la Universidad Católica de Temuco, Proyecto DIUCT 2001-3-05.

La mayoría de los métodos tradicionales de vitrificación utilizan la pajuela plástica francesa (french mini-straw) para la congelación, almacenamiento y descongelación de los embriones. El grosor de la pared de la esta pajuela conjuntamente con el hecho de que la solución crioprotectora está totalmente aislada del contacto con el nitrógeno líquido, debido al sellado previo de la pajuela, limitan la tasa máxima de congelación/descongelación a rangos de 2.438 °C/min. a 2.550 °C/min. (Vajta y col., 1998a, Vajta y col., 1999). Cuando los embriones son vitrificados en forma tradicional, en pajuelas plásticas, la formación de cristales de hielo se previene por el uso de altas concentraciones de crioprotectores y altas tasas de congelación/descongelación. Sin embargo, el uso del método de la técnica “Open Pulled Straw” (Pajuela abierta y estirada) y de otras tecnologías a permitido aumentar la velocidad de los cambios de temperatura, lo cual ofrece ciertas ventajas para la congelación, como son la disminución de las concentraciones de los crioprotectores utilizados, con los consecuentes menores efectos osmóticos y tóxicos, y además el paso más rápido por la zona de temperatura peligrosa, lo que produce menores daños por enfriamiento (chilling injurie).

En los últimos años se han descrito alternativas a la vitrificación tradicional, que permiten el contacto directo de la solución crioprotectora que contiene el o los embriones y el nitrógeno líquido, aumentando de esta forma las tasas de congelación/descongelación. Entre ellas destacan, el depósito directo de microgotas de solución crioprotectora conteniendo el embrión en el nitrógeno líquido (Riha y col., 1991), el uso de gradillas de microscopía electrónica como soporte de los embriones (Martino y col., 1996), el uso de micropipetas de vidrio (Kong y col., 2000) o el uso de pajuelas plásticas estiradas (Open Pulled Straws, OPS) con el uso del calor (Vajta y col., 1997b). Todas estas técnicas permiten alcanzar tasas de congelación/descongelación, que superan los 20.000°C/min, y, además, tiempos de contacto con los crioprotectores menores a 30 segundos a temperaturas sobre -180°C (Vajta y col., 1998a).

El grupo de investigadores que desarrolló el método “Open Pulled Straw” hizo los primeros reportes de vitrificación de embriones de cerdo (Vajta y col., 1997a) y embriones bovinos producidos *in vitro* (Vajta y col., 1997b) durante la segunda mitad de la década de los 90.

En nuestro país el desarrollo de la criopreservación de embriones bovinos, ya sea utilizando la congelación tradicional o la vitrificación, ha sido lento y sólo existe en la literatura un número limitado de trabajos que específicamente abordan la temática. Existen escasos reportes, en los cuales se utiliza la vitrificación tradicional para criopreservar embriones bovinos producidos *in vivo* (Ratto y col., 1998; Arteaga y col., 2002a) y solamente uno que describe el uso de la vitrificación tradicional para la criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro* (Arteaga, 2002b).

El presente trabajo describe, por primera vez en Chile, la vitrificación exitosa de blastocistos bovinos producidos *in vitro* utilizando el método “Open Pulled Straw”.

MATERIAL Y METODOS

Blastocistos expandidos bovinos fueron producidos mediante maduración, fecundación y co-cultivo *in vitro* con células oviductales, de acuerdo a protocolos previamente descritos (Ratto y col., 1999). Noventa y tres (93) blastocistos expandidos, producidos en cultivo *in vitro* los días 7, 8 y 9 post fecundación, fueron seleccionados de acuerdo a sus características morfológicas según los criterios estipulados por Eldsen y col. (1978), para ser sometidos a la vitrificación.

Pajuelas plásticas de 0.25 ml (Fench mini straws) fueron modificadas de acuerdo a lo descrito por Vajta (comunicación personal). En resumen, el tercio central de las pajuelas fue apoyado y calentado por 30 segundos sobre la esquina de una platina térmica a 90°C, hasta el evidente reblandecimiento del plástico. Una vez logrado esto ambos extremos fueron traccionados en un plano horizontal hasta lograr en la porción central la reducción del diámetro interno y externo a la mitad de la medida original, y

consecuentemente la disminución del grosor de la pared. Luego, se cortaron las pajuelas en la sección más delgada con un bisturí, para posteriormente ser esterilizadas utilizando luz ultravioleta y almacenadas hasta su uso. El volumen de solución crioprotectora que contendrá el extremo delgado de la pajuela será de 2 μ l, correspondiente al volumen de la gota desde la cual el embrión será cargado por capilaridad.

Los blastocistos fueron vitrificados de acuerdo a protocolos descritos por Vajta y col. (1998a). Brevemente, los embriones fueron retirados de las microgotas de cultivo y lavados en TCM199 (Sigma M-2520) adicionado con 20% Suero fetal bovino (GIBCO 16000-036). Posteriormente fueron depositados individualmente en la primera solución de vitrificación consistente en TCM199, 20% suero fetal bovino, 10% Etilenglicol (Fluka- 03750) y 10% Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma D-2650), a una temperatura de 39° C, por un 1 minuto. Luego fueron trasladados a la segunda solución de vitrificación consistente TCM199, 20% suero fetal bovino, 20% Etilenglicol y 20% Dimetilsulfóxido (DMSO). Desde esta solución el embrión fue tomado con una pipeta automática, en un volumen de 2 μ l, depositándose esta gota sobre el fondo de una placa petri, desde donde fue cargado por capilaridad con el extremo más delgado de la pajuela plástica previamente estirada. Inmediatamente después la pajuela fue sumergida en nitrógeno líquido, medio en el cual los embriones fueron mantenidos hasta su descongelación y posterior evaluación. El tiempo transcurrido desde que el embrión fue depositado en la segunda solución de vitrificación y el contacto con el nitrógeno líquido no fue mayor a 20 segundos.

Para la descongelación las pajuelas fueron retiradas individualmente desde el nitrógeno líquido y el extremo más delgado, que contenía la columna de medio congelado, fue rápidamente depositado en una solución 0.3M de Sucrosa (Merck 1.07687.0250) en TCM199, a una temperatura de 39° C por un período de 5 minutos, desde donde el embrión fue recuperado. Luego fueron trasladados a una solución 0.15M

de Sucrosa en TCM199, a la misma temperatura, por un período de 5 minutos. Posteriormente los embriones fueron trasladados a una solución de TCM199 adicionada con 20% suero fetal bovino para su lavado final. Desde esta última solución, los embriones fueron trasladados, en grupos de 1 a 4, a las microgotas de cultivo (50 μ l) de TCM199 adicionado con 20% suero fetal bovino y 0.1mM β -Mercaptoethanol (Sigma M-7522). Las condiciones generales de cultivo fueron 38.5°C, 5% CO₂ y atmósfera saturada de humedad.

La viabilidad embrionaria fue evaluada mediante observación directa, bajo lupa estereoscópica, cada 12 horas por el período que duró el cultivo *in vitro* (3 días). Los parámetros evaluados fueron la tasa de re-expansión o eclosión a las 24 horas y la tasa de eclosión a las 72 horas de cultivo *in vitro*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ochenta y tres (83) blastocistos fueron efectivamente recuperados al momento de descongelar las pajuelas, con una tasa de recuperación del 89% (83/93). Esta pérdida de embriones en el proceso de congelación/descongelación podría atribuirse al hecho de ser ésta la primera experiencia realizada con este método en nuestro laboratorio, y probablemente puede ser disminuida con un manejo más acabado de la técnica. Sin embargo, cabe destacar que estos valores no pueden ser comparados con resultados de otros autores ya que ningún reporte de vitrificación por este método hace mención al porcentaje de pérdida involucrado en el procedimiento. Ratto y col. (1998) reportan una tasa de pérdida de 20% al descongelar pajuelas que contenían blastocistos bovinos vitrificados en forma tradicional.

Cuatro (4.8%) de los embriones descongelados presentaron fractura de zona pelúcida. En general los valores de fractura de zona pelúcida reportados en trabajos de vitrificación con el método de OPS son bajos, con autores que describen ausencia de fractura (Vatja y col., 1998a) o incidencias tan bajas como el 1% (Vatja y col., 1997b). La fractura de la zona

pelúcida es un fenómeno común cuando los embriones son rápidamente congelados/descongelados en pajuelas tradicionales, alcanzando valores de 20 y 27% (Vatja y col., 1997b), esto, sin embargo, es mucho más reducido con el OPS, aunque las tasa de congelación y descongelación son mayores, debido a que con este método no ocurren los cambios de presión en la solución de congelación durante estos procesos, los que sí ocurren en la congelación con las pajuelas cerradas (congelación y vitrificación tradicional).

Los ochenta y tres (83) blastocistos recuperados fueron evaluados inmediatamente posterior a su descongelación y cada 12 horas, por 3 días de cultivo *in vitro* (cuadro 1). Al evaluar la viabilidad de los blastocistos 24 horas posterior a su descongelación se observó que 38 embriones (46%) presentaban una re-expansión completa y 7 (8%) ya se encontraban eclosionados, lo que implica que 45 blastocistos (54%) eran viables (cuadro 1). Las tasas de re-expansión reportadas en la literatura para esta técnica son superiores a nuestros resultados y fluctúan entre 69.2% (Lazar y col., 2000), 79.6% (Cho y col., 2002), 81% (Vatja y col., 1998a), 89% (Vatja y col., 1998b) y 93% (Vatja y col., 1999).

La tasa total de eclosión observada a las 72 horas de cultivo post descongelación alcanzó a un 29% (24/83) (cuadro 1). Este valor es también inferior a las tasa reportadas en la literatura, la

cuales alcanzan valores de 39.5% (Lazar y col., 2000), 51.8% (Cho y col., 2002), 77% (Vatja y col., 1998b) y 94-95% (Vatja y col., 1998a; Vatja y col., 1999).

Aunque nuestros resultados son inferiores a los reportados por otros autores, en especial a los de los investigadores que desarrollaron la técnica, estos tienden a aproximarse a los de otros autores, quienes han adaptado la técnica en los últimos años, lo cual es un indicador que nuestros resultados, consecuencia de esta experiencia preliminar, podrán ser mejorados. Otro factor que puede haber influido en disminuir las tasas de re-expansión y eclosión obtenidas, es la selección de los embriones para su vitrificación. Como ya se mencionó, se seleccionaron blastocistos expandidos de excelente y buena calidad, producidos en los días 7, 8 y 9 de cultivo *in vitro*. Sin embargo, el hacer más estrictos los criterios de selección, sólo vitrificando blastocistos producidos en día 7 de cultivo, probablemente aumentaría las tasas de viabilidad post descongelación, como lo demuestran diversos investigadores (Greeve y col., 1992; Mermillod y col., 1992; Del Campo y col., 1993).

Por otra parte, nuestros resultados son comparables a trabajos previos de vitrificación tradicional de embriones bovinos producidos *in vitro* en nuestro país (Arteaga y col., 2002b), quienes reportan una sobrevivencia del 50% a las 24 horas post descongelación, y a los resultados del trabajo de Ratto y col. (1998), quienes señalan

CUADRO 1: Evaluación de la tasa de re expansión y eclosión post descongelación de blastocistos bovinos producidos *in vitro* vitrificados por el método Open Pulled Straw.

Evaluation of post thawing re-expansion and hatching rate of *in vitro* bovine blastocysts vitrified by the Open Pulled Straw method.

Categoría embrionaria	Evaluación de la viabilidad embrionaria post descongelación (proporción y porcentaje de embriones por categoría)					
	12 hrs	24 hrs	36 hrs	48 hrs	60 hrs	72 hrs
Degenerado	39/83 (47%)	38/83 (46%)	41/83 (49%)	42/83 (51%)	45/83 (54%)	45/83 (54%)
Expandido	39/83 (47%)	38/83 (46%)	29/83 (35%)	22/83 (27%)	14/83 (17%)	14/83 (17%)
Eclosionado	5/83 (6%)	7/83 (8%)	13/83 (16%)	19/83 (22%)	24/83 (29%)	24/83 (29%)

tasas de re-expansión del 63% y tasas de eclosión del 33%, resaltando el hecho de que estos autores vitrificaron con la metodología tradicional, embriones producidos *in vivo*, cuya resistencia a los procedimientos de congelación/descongelación es superior a la de embriones producidos *in vitro* (Liebrich, 1991; Hasler y col., 1995).

Son múltiples las ventajas que presenta la utilización de la técnica "Open Pulled Straw" en comparación a la utilización de la pajuela plástica tradicional, las cuales pudieron ser comprobadas al utilizar esta metodología. Cabe destacar que, debido al adelgazamiento de la pared de la pajuela por el estiramiento, el efecto termo aislante de la misma disminuye. Esto conjuntamente con la disminución del volumen de la solución a congelar, por la reducción del diámetro interno, y el contacto directo entre la solución vitrificante y el nitrógeno líquido o el medio de descongelación hace que se aumenten las tasas de congelación/descongelación en 10 veces (Vatja y col., 1998a). También destaca el aumento en la rapidez y facilidad en el cargado de la pajuela por el aumento del efecto de la capilaridad. Producto del mismo efecto, la columna de medio que se forma al cargar el embrión en el extremo delgado de la pajuela, se encuentra en una posición más estable y no es dispersada al ingresar al nitrógeno líquido.

Por otra parte, el utilizar pajuelas abiertas permite una dilución inmediata de los crioprotectores durante la descongelación, con lo que se reduce el efecto tóxico y osmótico de la solución (Vatja y col., 1997b; Vatja y col., 1998a). Siendo además, un método de fácil aplicación, que permite usar, en términos generales, el mismo protocolo de manejo de los embriones y equipamiento de la congelación tradicional, tanto para la congelación, almacenaje y descongelación de los embriones (Vatja y col., 1997b).

Sin duda que una de las mayores limitantes de algunas de las técnicas de vitrificación, incluido el OPS, es el contacto directo con el Nitrógeno líquido, al cual son sometidos los embriones, lo que implica desde el punto de vista sanitario una gran desventaja por el riesgo de

contaminación, aunque mínimo. Estrategias para minimizar estas limitaciones han sido diseñadas por diversos autores, algunos de los cuales han desarrollado una aplicación estéril del método OPS, en la cual el nitrógeno líquido utilizado en el proceso de congelación es filtrado (0.2 μm) previo a su uso (Vajta y col., 1998b). Otros han optado por la alternativa denominada Closed Pulled Straw (CPS) en la cual se sella el extremo delgado de la OPS usando Polivinil alcohol, para evitar el contacto entre el Nitrógeno líquido y el medio que contiene el embrión (Chen y col., 2001; López-Bejar y López-Gatius, 2002).

El lograr altas tasas de eficiencia en la criopreservación de embriones bovinos es un requisito fundamental, y el complemento necesario para el desarrollo y establecimiento de la transferencia embrionaria en nuestro país. El adaptar las nuevas tecnologías de criopreservación embrionaria nos permitirá mejorar sustancialmente las tasas de éxito logradas hasta el momento con las metodologías tradicionales, dando un nuevo impulso al desarrollo de esta industria en nuestro país.

De acuerdo a lo reportado en este trabajo, podemos concluir que es factible la utilización del método de Open Pulled Straw para la vitrificación de blastocistos bovinos producidos *in vitro*, obteniéndose tasas aceptables de re-expansión y eclosión post descongelación.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue presentar los primeros resultados exitosos de vitrificación de blastocistos bovinos producidos *in vitro* utilizando la técnica del Open Pulled Straw (OPS) en nuestro país.

Para la confección de las OPS, pajuelas plásticas de 0.25 ml fueron estiradas utilizando calor. Los 93 blastocistos seleccionados para la vitrificación fueron depositados individual y secuencialmente en las soluciones de vitrificación 1 y 2 consistentes en TCM199 (20% SFB) adicionado con Etilénglicol y Dimetilsulfoxido (DMSO), por períodos de un minuto y 20 segundos respectivamente. Durante este último período el embrión fue cargado con

una micropipeta, en un volumen de 2 µl, depositándose sobre una placa petri desde la cual fue cargado por capilaridad en la pajuela estirada, para luego depositarla directamente en el nitrógeno líquido.

El 89% de los blastocistos congelados fueron recuperados post descongelación, de los cuales 54% se encontraban re-expandidos o eclosionados a las 24 horas de cultivo. Al evaluar los embriones a las 72 horas post descongelación se observó un 29% de embriones eclosionados. Aunque levemente inferiores a resultados reportados en la literatura, los nuestros indican la factibilidad de vitrificar exitosamente blastocistos bovinos producidos *in vitro* utilizando el método de Open Pulled Straw.

BIBLIOGRAFÍA

- ARTEAGA X., C. SHÜLER, R. GATICA. 2002a. Primer nacimiento de un ternero en Chile por transferencia de un embrión vitrificado. En: XXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal. Chillán – Chile, pp. 201-202.
- ARTEAGA X., C. SHÜLER, R. GATICA. 2002b. Primeros resultados de sobrevivencia de embriones bovinos vitrificados a los 7 y 10 días de cultivo *in vitro*. En: XXVII Reunión Anual Sociedad Chilena de Producción Animal. Chillán – Chile, pp. 203-204.
- CHEN, S. U., LIEN, Y. R., CHENG, Y. Y., CHENG, H. F., HO, H. N., Y. S., YANG 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum. Reprod.* 16:2350-2356.
- CHO, S. K., CHO, S. G., BAE, I. H., PARK, C. S. y I. K. KONG. 2002. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Anim. Reprod. Sci.* 73:151-158.
- DEL CAMPO, M. R., DONOSO, M. X., PALASZ, A. T., GARCIA, A., R. J. MAPLETOFT. 1993. The effect of days in co-culture on survival of deep frozen bovine IVF blastocyst. *Theriogenology.* 39: 208.
- ELDSEN, R. P., L. D. NELSON, G. E. SEIDEL Jr. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology.* 9: 17-26.
- FAHY, G. M., D. R. MACFARLANE, C. A. ANGELL, H. T. MERYMAN. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiol.* 21: 407-426.
- GREEVE, T, N. M. LOSKUTOFF, B. C. BUCKRELL, C. R. CHRISTIAN, S. P. LEIBO, K. J. BETTERIDGE. 1992. Morphology and freezing tolerance of *in vitro* derived bovine embryos after culture *in vivo* or *in vitro*. Cinquieme colloque Franco-Tchecoslovaque sur la reproduction des animaux domestiques. Jouyen – Josas, France. 36. En : GORDON, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB INTERNATIONAL, United Kingdom.
- HASLER J. F., W. B. HENDERSON, P. J. HURTGEN, Z. Q. JIM, A. D. McCAULEY, S. A. MOWER. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology.* 43: 141-152.
- KASAI, M. 1997. Vitrification: Refined strategy for the cryopreservation of mammalian embryos. *J. Mamm. Ova Res.* Vol. 14: 17-28.
- KASAI, M., J. H. KOMI, A. TAKAKAMO, H. TSUDERA, T. SAKURAI, T. MACHIDA. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.* 89: 91-97.
- KASAI, M., Y. HAMAGUCHI, T. S. E. ZHU, T., MIYAKE, T. SAKURAI, T. MACHIDA. 1992. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-base solution by a simple method. *Biol. Reprod.* 46: 1042-1046.
- KONG, I. K., S. I., LEE, S. G., CHO, S. K., CHO, C. S. PARK. 2000. Comparison of open pulled straw (OPS) v/s glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocyst. *Theriogenology.* 53: 1817-1826.
- LAZAR, L., SPAK, J., V. DAVID. 2000. The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology.* 54:571-578.
- LIEBRICH, J. 1991. Untersuchung zur *in vivo* weiterentwicklungskapazität nach transfer *in vitro* produzierter Rinderembryonen. L. M. U. Munich Diss. pp: 1 - 127, Alemania. En: PALMA, G. A. y G. Brem. 1993. Transferencia de embriones y biotecnologías de la reproducción en la especie bovina. Editorial Hemisferio Sur S. A., Argentina.
- LÓPEZ-BEJAR, M., LÓPEZ-GATIUS F.. 2002. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology.* 58:1541-1552.
- MARTINO, A., N. SONGSASEN, S. P. LEIBO. 1996. Development into blastocyst of bovine oocytes

- cryopreserved by ultra rapid cooling. *Biol. Reprod.* 54: 1059-1069.
- MERMILLOD, P., C. BOCCART, C. WILS, A. MASSIP, F. DESSY. 1992. Effect of oviduct conditioned medium and of cumulus cells on bovine embryo development *in vitro*. *Theriogenology.* 37:256.
- MUKAIDA, T., S., WADA, K., TAKAHASHI, P.B. PEDRO, T.Z., AN, M. KASAI. 1998. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Human Reprod.* 13: 2874-2879.
- OBERSTEIN, N., M. K. O'DONOVAN, J. E. BREUMMER, G. E. JR. SEIDEL, E. M. CARNEVALE, E. L. SQUIRES. 2001. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology.* 55: 607-613.
- RALL, W. F., G. M. FAHY. 1985. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature.* 313: 573-575.
- RATTO, M., BERLAND, M., WOLTER, M., SILVA, M., MATAMOROS, R.. 1998. Vitrificación de embriones bovinos: Antecedente preliminar. *Arch. Med. Vet.*, 30, número extraordinario. 187-188.
- RATTO, M., M. BERLAND, M. WOLTER, R. MATAMOROS. 1999. Desarrollo de embriones bovinos obtenidos por fecundación *in vitro* cultivados con células oviductales o medio condicionado y transferidos a hembras receptoras. *Arch. Med. Vet.* 31:89-96.
- RIHA, J., V. LANDA, J. KNEISSL, J. MATUS, J. JINDRA, Z. KLOUCEK. 1991. Vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after non surgical transfer. *Zivoc Vir.* 36: 113-120.
- SCHIEWE, M.C., W. F., RALL, L. D. STUART, D. E., WILDT. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology.* 36: 279-293.
- VAJTA, G., P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1997a. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. *Acta Vet. Scand.* 38: 349-352.
- VAJTA, G., P.J. BOOTH, P. HOLM, M. KUWAYAMA, P.J. BOOTH, T. GREVE, H. CALLESEN. 1997b. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-letter.* 18: 191-195.
- VAJTA, G., P. HYTTTEL, H. CALLESEN. 1997c. Morphological changes of *in vitro* produced bovine blastocysts after vitrification, *in straw* direct rehydration and culture. *Mol. Rep. and Develop.* 48:9-17.
- VAJTA, G., P. HOLM, M. KUWAYAMA, P.J. BOOTH, H. JACOBSEN, T. GREVE, H. CALLESEN. 1998a. Open Pulled Straw (OPS) Vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Rep. and Develop.* 51:53-58.
- VAJTA, G., I. M. LEWIS, M. KUWAYAMA, T. GREVE, H. CALLESEN. 1998b. Sterile application of the open pulled straw (OPS) vitrification method. *Cryo-letters.* 19: 389-392.
- VAJTA, G., N. RINDOM, T.T. PEURA, P. HOLM, T. GREVE, H. CALLESEN. 1999. The effect of media, serum and temperature on *in vivo* survival of bovine blastocyst after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology.* 52: 939-948.
- YUSWIATI, E., W. HOLTZ. 1990. Successful transfer of vitrified goat embryos. *Theriogenology.* 34: 629-632.

