

## CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES BOVINOS

P. Rodríguez Villamil<sup>12</sup> y G.A. Bó<sup>13</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Paraje Pozo del Tigre, Gral. Paz (5145), Córdoba, Argentina

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

<sup>3</sup> Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Villa María, Córdoba, Argentina

E-mail: gabrielbo@iracbiogen.com.ar

### Introducción

Durante los últimos 25 años, se ha observado que la producción de embriones bovinos (*in vivo* e *in vitro*), ha crecido de forma progresiva (Thibier, 2001-2009), en especial en el área de la producción *in vitro* (PIV). Consecuentemente, esto ha generado la necesidad de criopreservación de los embriones excedentes de dichas producciones. Sin embargo, la criopreservación de los embriones PIV, por medio de los métodos convencionales de congelamiento, no ha alcanzado tasas de supervivencia satisfactorias (Vajta, 2000), debido a sus características físicas, lo que ha llevado a la utilización de otros métodos como es el de vitrificación. Este método, con curvas de enfriamiento superiores a las del congelamiento, va a permitir la reducción del tiempo de exposición del embrión en los puntos críticos de temperatura, disminuyendo así los daños térmicos y mecánicos causados durante la formación de hielo y aumentando la viabilidad de los embriones posterior a su vitrificación (Lazar, 2000; Vajta y Kuwayama, 2006; Mucci *et al.*, 2006). No obstante, es importante resaltar, que a pesar del alcance conseguido con estas técnicas hasta hoy, aun es necesario el desarrollo de nuevos métodos y la búsqueda de nuevas perspectivas que optimicen la vitrificación de embriones PIV. Para así, tal vez en un futuro no muy lejano, alcanzar la comercialización este tipo de embriones de la misma forma que han alcanzado hasta hoy los embriones producidos *in vivo*.

### Criopreservación de embriones

La criopreservación de embriones surgió como consecuencia de un aumento en la productividad de animales de alto valor genético, así como la necesidad de conservación y comercialización de este material alrededor del mundo (Vajta, 2000). Convirtiéndose, en uno de los procedimientos de rutina en la transferencia de embriones de la mayoría de las especies domesticas (Palasz *et al.*, 2000).

Desde la primera criopreservación realizada con éxito en 1972, en embriones de ratón por Whittingham y col., innumerables protocolos se fueron desarrollando en las diferentes especies domesticas. La idea principal en la generación de estas nuevas tecnologías, fue dirigida al mejoramiento de los sistemas de criopreservación, con la intención, no solo de almacenar embriones a bajas temperaturas (-196°C), intentando mantener su integridad, sino también con la idea de poder transportar y transferir dichos embriones de forma comercial e inocua.

Este primer objetivo fue alcanzado en 1992, cuando Voelkel y Hu mostraron la efectividad del Etilenglicol a la concentración de 1.5 M, como crioprotector de embriones bovinos para la transferencia directa de los mismos. Este paso fue fundamental, al permitir obtener tasas de preñez entre el 50 al 70 % post-descongelado (Niemann, 1995), y simplificar sustancialmente el procedimiento de transferencia, eliminando la necesidad de un personal entrenado y de equipos especializados.

Por lo tanto, este método de criopreservación conocido como método de congelamiento lento, fue el primero a ser introducido para la criopreservación de embriones bovinos, siendo hoy el mas utilizado comercialmente (Vajta, 2000). Sin embargo, su habilidad para prevenir la formación de hielo aun es limitada, y sus resultados en la criopreservación de embriones *in vitro* han sido variables (Hasler *et al.*, 1995; Massip *et al.*, 1995; Hoshi *et al.*, 1996; Kaidi *et al.*, 2001), y menores en comparación a los datos obtenidos en embriones *in vivo* (Alvarenga *et al.*, 2007; Dinnyes & Nedambale, 2009).

La viabilidad de los embriones producidos *in vitro*, en comparación con los *in vivo*, es menor probablemente debido a las características físicas propias de este tipo de embriones, que hace que sean más sensibles al momento de ser expuestos a bajas temperaturas (Rodrigues, 1996; Vajta *et al.*, 1997; Dinnyes y Nedambale, 2009). Entre dichas características, se encuentran no solo las características morfológicas sino también fisiológicas de este tipo de embriones, como: el aumento en el número de vacuolas (Shamsuddin *et al.*, 1992), mayor fragilidad de su zona pelúcida (Duby *et al.*, 1997), menor compactación embrionaria (Van Soom *et al.*, 1992), menor número de blastómeros, sobre todo a nivel de masa celular interna (Iwasaki *et al.*, 1990; Rizos *et al.*, 2002), alteraciones en la expresión génica (Niemann & Wrenzycki, 2000; Lazzari *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2003; Lonergan

*et al.*, 2003), mayor incidencia de apoptosis (Pomar *et al.*, 2005) y principalmente un aumento en el alto contenido citoplasmático de lípidos (Massip *et al.*, 1995; Ferreira *et al.*, 2010).

Por estas razones y en especial la última, el método de congelamiento convencional, disminuye considerablemente las tasas de viabilidad en este tipo de embriones (Pereira & Marques, 2008). El aumento de los tiempos de exposición, debido al descenso progresivo de la temperatura, durante el congelamiento, va a ser que el embrión permanezca un tiempo mayor en la franja de temperatura termotrópica de la transición de los lípidos, afectándolo considerablemente (Zeron *et al.*, 1999). En un experimento realizado en nuestro laboratorio (Rodríguez Villamil *et al.*, datos aun no publicados), pudimos confirmar dicha observación, al comparar la viabilidad post-descongelado de los embriones bovinos producidos *in vivo* versus los producidos *in vitro*. El método de congelación utilizado fue el convencional, exponiendo los embriones producidos *in vivo* (n= 100) e *in vitro* (n=120), a una solución de etilenglicol 1.5 M por un periodo de 5 min, para posteriormente congelarlos con tasas de enfriamiento de -0.5°C/min (Freeze control, Cryologic®, Australia). Los resultados de este experimento demostraron que la viabilidad (% eclosión), a las 72 horas post-descongelado de los embriones bovinos *in vitro* (26/120; 21 %) fue inferior a la de los producidos *in vivo* (81/100; 81 %) (P<0.05).

Sin embargo, la vitrificación como método de criopreservación, se ha convertido en una alternativa para la conservación de este tipo de embriones. Con curvas de enfriamiento más rápidas ( $\approx 25000$  °C/min), ha permitido la formación de un estado vítreo sin la presencia de formación de hielo, disminuyendo así, los daños químicos y mecánicos causados por el paso entre los puntos críticos de congelación (Dobrinsky, 1996; Martino *et al.*, 1996; Kasai, 2002). Nosotros, pudimos observar nuevamente esta afirmación, dentro de los datos colectados en una segunda parte del experimento (Rodríguez Villamil y col., datos sin publicar), en el que se comparo, la viabilidad de embriones producidos *in vitro* congelados vs vitrificados. Los embriones para esta parte del experimento fueron, criopreservados por el método convencional de congelamiento (Freeze control, Cryologic®, Australia) o por medio de vitrificación por el método de superficie sólida (CVM, Cryologic®, Australia). Los resultados de este experimento demostraron que la viabilidad de los embriones *in vitro* vitrificados (70/123; 57 %) fue mayor que la de los congelados (26/120; 21 %) (P<0.05). De igual forma, varios autores, reportaron el aumento de las tasas de supervivencia después de la vitrificación, al comparar las dos metodologías (Dinnyes *et al.*, 1995; Hasler *et al.*, 1995; Reinders *et al.*, 1995; Agca *et al.*, 1996; Vajta *et al.*, 1997; Lane *et al.*, 1999; O’Kearney Flynn *et al.*, 1998; Sommerfeld & Niemann, 1999; Kaidi *et al.*, 2001; Mezzalira *et al.*, 2004; Alvarenga *et al.*, 2007). Además, la vitrificación es una técnica que tiene otras ventajas comparativas frente al congelamiento tradicional, al utilizar procedimientos mas simples, no necesitar de equipos costosos y requerir de poco tiempo para su realización (Baril *et al.* 2001).

### Vitrificación

Gracias a sus posibles efectos benéficos, esta metodología ha tomado gran importancia en la criopreservación no solo de embriones *in vitro*, sino también de ovocitos y embriones producidos *in vivo*. Sin embargo, desde el primer procedimiento realizado con éxito en embriones mamíferos por Rall & Fahy en 1985, la vitrificación ha sufrido múltiples modificaciones, en el intento por simplificar sus procedimientos y mejorar las tasas de viabilidad de las estructuras. Inicialmente, varios de los estudios fueron enfocados, en la disminución los efectos tóxicos y osmóticos causados por las altas concentraciones de los crioprotectores (Kasai & 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 mayor (4-8 M) a las utilizadas normalmente en el congelamiento (1-2 M) (Woods *et al.*, 2004). Por lo tanto, la disminución de estos efectos deletéreos, va a ser obtenida a través de la utilización de crioprotectores menos tóxicos, y el establecimiento de volúmenes, niveles de concentración menores, así como su temperatura y tiempos de exposición (Liebermann *et al.*, 2003). El uso de soluciones crioprotectoras con bajo peso molecular es una de estas estrategias. Los crioprotectores al tener una mayor permeabilidad, van a permitir la reducción de los tiempo de exposición, y la minimización de los niveles de concentración, previniendo el daño osmótico causado en las células (Kasai & Mukaida, 2004). Entre los crioprotectores de bajo peso molecular, el más ampliamente utilizado 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 candidatos para ser empleados en la vitrificación de embriones (Ishimori *et al.*, 1992; Hubalek, 2003). De igual forma, la asociación de uno o más agentes crioprotectores, con características más estables, permitirá la utilización de soluciones más simples y la reducción de la toxicidad específica de los agentes. De acuerdo con algunos investigadores, la permeabilidad de la combinación de crioprotectores es mayor que la de sus componentes de forma individual (Vajta & Nagy, 2006). La asociación mas comúnmente utilizadas en vitrificación es la compuesta por EG y DMSO (Mezzalira *et al.*, 2004; Vajta & Nagy, 2006), sin embargo esta puede ser reemplazada por otro tipo de asociaciones de agentes crioprotectores, como el EG y PROH, obteniendo excelentes resultados en la vitrificación de embriones producidos *in vitro* y ovocitos inmaduros (Vieira *et al.*, 2008). La adición de crioprotectores no permeables, tales como disacáridos (sucrosa, trealosa) o macromoléculas (Ficoll, polivinilalcohol (PVA), polivinilpirrolidona (PVP)), igualmente van a ayudar en la reducción de la

toxicidad de los crioprotectores, ya que ayuda a disminuir los niveles de crioprotector dentro de las células (Liebermann, 2003; Kasai & Mukaida, 2004)

Por otro lado, los grandes volúmenes de crioprotectores también son limitantes de las tasas de enfriamiento. Los primeros contenedores utilizados con éxito en la vitrificación de ovocitos y embriones, fueron las pajuelas de inseminación, las cuales utilizaban grandes volúmenes (>20 µL), que solo alcanzaban tasas de enfriamiento de 2500°C/min (Palasz & Mapletof, 1996). Posteriormente, con la invención de contenedores de menor volumen (<5 µL), asociado con el contacto directo con el nitrógeno líquido, se consiguió aumentar las tasas de enfriamiento hasta casi los 30.000°C/min (He *et al.*, 2008). La mayoría de estos contenedores además permitieron la disminución de las concentraciones de los crioprotectores, disminuyendo el daño tóxico y mecánico causado por la vitrificación. Entre los innumerables dispositivos creados están: el tamaño mínimo de la gota (MDS) (Arav, 1992), los electron microscope grids (EM) (Martino *et al.*, 1996), las open-pulled straw (OPS) (Vajta *et al.*, 1998), los cryoloop (Lane *et al.*, 1999), el volumen mínimo de congelación (MVC) (Hamawaki *et al.*, 1999), el sistema de hemi-pajuela (Vanderzwalde *et al.*, 2000), la superficie sólida de vitrificación (Dinnyes *et al.*, 2000), los gel-loading tips (Tominaga & Hamada, 2001), las closed-pulled straw (CPS) (Chen *et al.*, 2001), nylon mesh (Matsumoto *et al.*, 2001), flexipet denuding pipette (FDP) (Liebermann *et al.*, 2002), las superfinely open-pulled straw (SOPS) (Isachenko *et al.*, 2003), las micropipetas plásticas de diámetro fino (Cremades *et al.*, 2004), 100 µL pipetting tip (Hredzak *et al.*, 2005), cryoTip (Kuwayama *et al.*, 2005) y cryotop (Kuwayama *et al.*, 2005). Dentro de estos, el envase más usado comúnmente es el método de la open pulled straw (OPS), la cual alcanza tasas de enfriamiento de más de 20,000 °C/min, disminuyendo los daños tóxicos y osmóticos en las células (Vajta *et al.*, 1998). Sin embargo, posteriores modificaciones de este modelo consiguieron aumentar aún más las tasas de enfriamiento, al utilizar para su fabricación diferentes materiales distintos al plástico. El plástico debido a sus características físicas, tiene una baja conductividad de calor, que limita las tasas de congelamiento, por lo tanto el uso de otros materiales con mayor conductividad como el vidrio (Mezzalana *et al.*, 1999), el metal (Bunn *et al.*, 2006), o el cuarzo (He *et al.*, 2008), permiten aumentar el intercambio de calor y las tasas de enfriamiento, alcanzando velocidades de casi 30.000°C/min. Varios autores, demostraron esta eficiencia, al alcanzar mayores tasas de congelamiento con micropipetas de vidrio (GMP) en comparación con las OPS, y mayores tasas de supervivencia post-vitrificación, debido a una mayor conductividad y la utilización de un menor volumen de crioprotectores (Kong *et al.* 2000; Cho *et al.*, 2002).

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 súper-congelado, reduce el punto de ebullición, mediante la estabilización a través de la presión negativa, reduciendo el efecto aislante del vapor del nitrógeno, permitiendo una mayor eficiencia en la transferencia de calor entre las muestras y el nitrógeno líquido (Vieira *et al.*, 2008). De esta forma, el nitrógeno líquido va a alcanzar temperaturas de -210°C, y permitirá alcanzar curvas de congelamiento más rápidas, que reduzcan la posibilidad de desvitrificación y recristalización de las muestras durante el descongelamiento (Arav *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2006).

Es claro que la criopreservación de embriones *in vitro* está ligada a la calidad en el proceso de producción. Por tanto, para poder generar métodos más eficientes de criopreservación se va a necesitar no solo el desarrollo de nuevas tecnologías sino igualmente de modificaciones dentro del proceso de producción que permitan una mayor supervivencia de los embriones al momento de la vitrificación. La modificación de los medios de cultivo, puede ser una de las opciones. El desarrollo de mejores sistemas de cultivo, va a mejorar considerablemente la calidad embrionaria y por tanto la criotolerancia de los embriones, al punto de que metodologías como el sistema de congelamiento convencional, pueden ser igualmente utilizadas con éxito en la criopreservación de este tipo de embriones (Nedambale *et al.* 2004). Varios estudios han demostrado que la producción de embriones *in vitro* en cierto tipo de medios de cultivo (Leibo & Loskutoff, 1993; Mahmoudzadeh *et al.*, 1994; Massip *et al.*, 1995) o a través del co-cultivo con células de la granulosa o células vero (Leibo & Loskutoff, 1993; Desai *et al.*, 2000) puede aumentar las tasas de supervivencia de los embriones post-vitrificación.

El suero y la composición de lípidos en los sistemas de cultivo pueden cumplir un papel importante 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 & Suzuki 1997) y su sensibilidad a la criopreservación (Dinnyes *et al.* 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 al.* 1996), así como la reducción del contenido citoplasmático de lípidos en los embriones con etosulfato de fenazina (PES) (Seidel, 2006), la adición del hialuronato de sodio (Palasz *et al.* 2008) o ácido linoleico (Hochi *et al.* 1999; Laowtammathron *et al.* 2005; Pereira & Marques 2008) aumentan 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 micro-manipulación, aumentando así las tasas de supervivencia de los embriones criopreservados (Diez *et al.* 1996).

La formación de radicales libres durante la criopreservación también puede causar daño celular y disminuir la viabilidad de los embriones. Razón por la cual, la adición de EDTA (0.1mM) y/o glutatión (GSH; 1 mM) en el cultivo antes de la vitrificación pueden 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 al.*, 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 al.*, 2006). Otras de las estrategias de optimización del proceso de vitrificación, pueden realizarse por medio de la modificación de las características propias del embrión antes de ser expuesta al proceso de criopreservación. Por ejemplo, la inyección de trealosa en ovocitos, aumenta la protección de las estructuras y disminuye los efectos deletéreos debido a la toxicidad de los crioprotectores (Ergolu *et al.*, 2003), la reducción artificial del fluido blastocelico, puede reducir el shock osmótico, los problemas de permeabilidad y la formación de cristales de hielo (Vanderzwalmen *et al.*, 2002; Son *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005) y la estabilización del citoesqueleto con la adición de citocalasina B (Dobrinsky *et al.*, 2000), reduce la despolimerización de los microfilamentos y microtúbulos, mejorando las tasas de sobrevivencia de los ovocitos y embriones criopreservados. Por lo tanto, estas todas estas metodologías serán probablemente útiles, al minimizar ciertas anomalías celulares propias de los embriones producidos *in vitro* y hacer con que sean cada vez menos sensibles a la vitrificación.

## Referencias Bibliográficas

- 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.
- Alvarenga, M.A., Fernandes, C.B., Landim-Alvarenga, F.C. 2007. Criopreservación de equine embryos. *Acta Scientiae Veterinariae* 35(Supl 3): 799-809.
- Arav, A. Vitrification of oocytes and embryos. 1992. In: *Embryonic Development and Manipulation in Animal Production*. Lauria, A., Gandolfi, F., Portland Press, London and Chapel Hill, Cap. 22: 255-264.
- 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.
- Baril, G., Traldi, A.L., Cognié, Y., Leboeuf, B., Cbeckers, J.F., Mermillod, P. 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology* 56: 299-305.
- Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W.J., Evans, J.F. and Dressel, M.A. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27: 147-158.
- Bunn S *et al.* 2006. Reduction in cryoprotectant concentrations on the vitrification of immature bovine oocytes, under a high cooling rate. *Acta Scientiae Veterinariae* 34: 309.
- Chen SU *et al.* 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 Reproduction* 16: 2350-2356.
- Cho SK *et al.* 2002. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Animal Reproduction Science* 73: 151-158.
- Cremades N *et al.* 2004. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. *Human Reproduction* 19: 300-305.
- Cutaia, L.E. and Bó, G.A. 2007. Cattle embryo production and trade in Argentina. *Acta Scientiae Veterinariae* 35(Supl 3): 931-944.
- Desai, N., Lawson, J., Goldfarb, J. 2000. Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. *Human Reprod.* 15: 410-418.
- Dinnyes A *et al.* 1995. *In vitro* survival of IVF bovine embryos frozen or vitrified by techniques suitable for direct transfer. *Theriogenology* 43: 197.
- Dinnyes A *et al.* 2000. High development rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 63: 513-518.
- Dinnyes, A. and Nedambale, T.L. 2008. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. *Reproduction, Fertility and Development* 21: 45-59.
- Dobrinsky, J.R. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45: 17-26.
- Dobrinsky, J.R., Pursel, V.G., Long, C.R., Johnson, L.A. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod.* 62: 564-570.
- Duby, R. T., Hill, J. L., O'Callaghan, D., Overstrom, E. W. and Boland, M. P. 1997. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology* 47: 332.
- Eroglu, A., Lawitts, J.A., Toner, M., Toth, T.L. 2003. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology* 46:121-34.
- Fahy GM. *et al.* 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21: 407-426.
- Ferreira *et al.* 2010. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J Lipid Res.* 51:1218-1227.
- Hamawaki, A., Kuwayama, M., Hamano, S. 1999. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology* 51:165.
- Hasler, J.F. *et al.* 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141-152.
- He, X., Park, E.Y.H., Fowler, A., Yarmush, M.L., 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: 223-232.
- Hochi, S., Semple, E. and Leibo, S. P. 1996. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 46: 837-847.
- 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* 52:497-504.
- Hredzak, R *et al.* 2005. Clinical experience with a modified method of human embryo vitrification. *Ceska Gynekol* 70: 99-103.

- Hubálek, Z. 2003. Protectants used in the Cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* 46: 205-29.
- Isachenko V., J.Folch, E. Isachenko, F. Nawroth, A. Krivokharchenko, G. Vajta, M.Dattena and J. L. Alabart 2003. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology* 60: 445-452.
- Ishimori, H., Takahashi, Y., Kanagawa, H. 1992. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. *Theriogenology* 37: 481-487.
- 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: 279-284.
- Kaidi S et al. 2001. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biology of Reproduction* 65: 1127-1134.
- Kasai, M. 2002. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. *Reproductive Medicine and Biology* 1: 1-9.
- Kasai, M., Mukaida, T. 2004. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproductive Biomedicine online* 9: 164-170.
- Kong, I.K. et al. 2000. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology* 53:1817-1826.
- Kuwayama, M. et al. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive BioMedicine Online* 11: 608-614.
- Lane, M., Bavister, B.D., Lyons, E.A., Forest, K.T. 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol.* 17: 1234-1236.
- 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* 64:1185-1196.
- Lazar, L., Spak, J., David, V. 2000. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology* 54:571-8.
- Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruip, T., Niemann, H. and Galli, C. AÑO. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol. Reprod.* 67:767-775.
- Leibo, S.P., Loskutoff, N.M. 1993. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 39:81-94.
- Liebermann, J. et al. 2002. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reproductive BioMedicine Online* 4: 146-150.
- Liebermann, J. et al. 2003. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now?. *Reproductive Biomedicine Online* 7: 623-633.
- Lonergan, P. et al. 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.* 69:1424-31.
- Mahmoudzadeh, A.R., Van Soom, A., Ysebaert, M.T., de Kruif, A. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro-produced cattle embryos. *Theriogenology* 42:1389-1397.
- Martino, A., Songsasen, N., Leibo, S.P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction* 54: 1059-1069.
- Massip, A., Mermillod, P., Dinnyes, A. 1995. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reproduction* 10: 3004-3011.
- Massip, A. 2001. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. *Reprod. Dom. Anim.* 36: 49-55.
- Matsumoto, H. et al. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 42: 139-144.
- Mezzalira, A. et al. 1999. Vitriificação de oócitos bovinos em micropipetas de vidro. *Acta Scientiae Veterinariae* 27: 262.
- Mezzalira, A., Mezzalira, J.C., Moraes, A.N. 2004. Vitrification of bovine embryos: Age of embryos and exposure time to cryoprotectant influences viability. *Arch. of Vet. Sci.* 9:107-111.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J., Alberio, R.H. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65:1551-62.
- Nedambale, T.L., Du, F., Yang, X., Tian, X.C. 2006. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with  $\beta$ - mercaptoethanol. *Anim Reprod. Sci.* 93:61-75.
- Niemann, H. and 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: 21-34.
- O'Kearney-Flynn, M., Wade, M., Dufy, P., Gath, V., Boland, M.P., Dobrinsky, J.R. 1998. Effect of cryopreservation on IVP cattle development in vitro and in vivo. *Theriogenology* 49: 173.
- Palasz, A.T., Mapletof, R.J. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnology Advances* 14: 127-149.
- Palasz, A.T., Breña, P.B., Martinez, M.F., Perez-Garnelo S.S., Ramirez, M.A., 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: 39-47.
- Pereira, R.M., Marques, C.C. 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank* 9:267-77.
- Pomar, F. J., Teerds, K. J., Kidson, A., Colenbrander, B., Tharasanit, T. and 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: 2254-2268.
- Rall, W.F., Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573-575.
- Reinders, J.M.C., Wurth, Y.A., Kruip, T.A.M. 1995. From embryo to a calf after embryo transfer, a comparison of in vivo and in vitro produced embryos. *Theriogenology* 43: 306.

- Rizos, D., Fair, T., Papadopoulos, S., Boland, M. P. and 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.
- Rizos *et al.* 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* 68:236-243.
- Rodrigues, J.L. 1996. Effect of pre-equilibration in 1.5 or 3.6M Ethylene glycol on the survival of day-7 IVMFC bovine blastocysts vitrified in EFS solution. *Theriogenology* 45:168.
- 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: 741-746.
- Santos, R.M. *et al.* 2006. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. *Ciência Rural* 36: 1501-1506.
- Seidel, G.E. Jr. 1986. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. *Techniques for freezing mammalian embryos: Short course proceedings*. Animal reproduction laboratory, Colorado State University, Fort Collins, 1986:6.
- Seidel, G.E. Jr. 2006. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology* 65: 228-235.
- Shamsuddin, M, Larsson, B, Gustaffson, H, Gustari, S, Bartolome, J, Rodriguez-Martinez, H. 1992. Comparative morphological evaluation of *in vitro* and *in vivo* produced bovine embryos. *International Congress on Animal Reproduction* 3:1333-35.
- Sommerfeld, V, Niemann, H. 1999. Cryopreservation of Bovine *in Vitro* Produced Embryos Using Ethylene Glycol in Controlled Freezing or Vitrification. *Cryobiology* 38: 95-105.
- Son, W.Y., Yoon, S.H., Yoon, H.J., Lee, S.M. and Lim, J.H. 2003. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum. Reprod* 18: 137-139.
- Thibier, M. 2001. The animal embryo transfer industry in figures. *Embryo Transfer Newsletter* 19:16-22.
- Thibier, M. 2002. A contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry. *Embryo transfer newsletter* 20:13-19.
- Thibier M. 2003. More than half a million bovine embryos transferred in 2002. *Embryo Transfer Newsletter* 21:12-19.
- Thibier, M. 2004. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. *Embryo Transfer Newsletter* 22: 12-19.
- Thibier, M. 2005. Significant increases in transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle and contrasted trends in other species in 2004. *Embryo Transfer Newsletter* 23:17-22.
- Thibier, M. 2006. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. *Embryo Transfer Newsletter* 24:12-18.
- Thibier, M. 2007. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. *Embryo Transfer Newsletter* 25: 4-9.
- Tominaga, K., Hamada, Y. 2001. Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development* 47: 267-273.
- Vajta, G. 1997. Vitrification of bovine oocytes and embryos. *Embryo Transfer Newsletter* 15:12-8.
- Vajta, G. *et al.* 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development* 51: 53-58.
- Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:357-64
- Vajta, G., Kuwayama, M. 2006. Improving Cryopreservation systems. *Theriogenology* 65: 236-24.
- Vajta, G., Nagy, Z.P. 2006. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive BioMedicine Online* 12: 779-796.
- Van Soom, A., Van Vlaenderen, I., Mahmoudzadeh, A.R., Deluyker, H., Kruif, A. 1992. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology* 38: 905-919.
- Vanderzwalmen, P *et al.* 2000. "*In vitro*" survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocyst after vitrification in an hemi-straw (HS) system. *Fertility and Sterility* 74: 215-216.
- Vanderzwalmen, P. *et al.* 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Human Reproduction* 17: 744-751.
- Viana, J.H.M., Camargo, L.S.A. 2007. Bovine embryo production in Brazil: A new scenario. *Acta Scientiae Veterinariae* 35(Supl 3): 915-924.
- Vieira, A.D., Forell, F., Feltrin, C.; Rodrigues, J.L. 2008. Calves born after direct transfer of vitrified bovine *in vitro*-produced blastocysts derived from vitrified immature oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 43: 314-318.
- Volkel, S.A., Hu, Y. X. 1992. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 37: 23-37.
- Woods, E.J. *et al.* 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48: 146-156.
- Zeron, Y., Pearl, M., Borochoy, A., Arav, A. 1999. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology* 38: 35-42.