

## **VITRIFICACIÓN: UNA ALTERNATIVA PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES**

### **Vitrification: An Embryo Cryopreservation Alternative**

Pedro Cabrera<sup>\*,1</sup>, Adriana Fernández<sup>\*</sup>, Pedro Bastidas<sup>\*</sup>, Magaly Molina<sup>\*\*</sup>,  
Angélica Bethencourt<sup>\*\*\*</sup> y Thaís Díaz<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>*Instituto de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela (FCV-UCV), Apartado 4563, Maracay 2101A, Estado Aragua, Venezuela.* <sup>\*\*</sup>*Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Sanidad Animal, Apartado 70, Maracay 2101A, Estado Aragua, Venezuela.*

<sup>\*\*\*</sup>*Laboratorio de Hemoparásitos, Cátedra de Parasitología, FCV-UCV.*

**Correo-E: cabrerap@ucv.ve**

Recibido:05/04/06 - Aprobado: 18/04/07

#### **RESUMEN**

A nivel mundial, la técnica de criopreservación de embriones mamíferos más utilizada es la criopreservación lenta o estándar, la cual hace uso de equipos de criopreservación programados que descienden la temperatura a una tasa constante; sin embargo, la implementación de técnicas avanzadas de criopreservación como la vitrificación, surge como una alternativa factible. Debido a la importancia que ha tomado esta técnica de criopreservación desde su aparición en 1985, se ha desarrollado la presente revisión, abordando aspectos básicos de la técnica y detallando algunos factores que intervienen en todo el proceso de vitrificación de embriones.

**(Palabras clave:** Ganado bovino, vitrificación, embriones animales, conservación biológica)

#### **ABSTRACT**

The most commonly used cryopreservation technique for mammalian embryos is the standard cryopreservation method, which uses programmed equipments for freezing, that decrease temperature at a constant rate. However, implementation of more advanced techniques for cryopreservation, as vitrification, rises as an alternative worldwide. Because of the importance that vitrification has reached since its beginning in 1985, this review focuses on basic aspects of the technique and details some factors that affect the whole process of embryo vitrification.

**(Key words:** Cattle, vitrification, animal embryos, biological preservation)

## INTRODUCCIÓN

La vitrificación se refiere al proceso físico de solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo. El fenómeno puede ser considerado como un incremento extremo de la viscosidad, que requiere de altas tasas de enfriamiento y calentamiento (Vajta y Kuwayama, 2006).

Estas tasas de enfriamiento necesitan el uso de soluciones de crioprotectores con concentraciones de 5 a 7 M, las cuales son más altas que las requeridas por la congelación equilibrada tradicional de aproximadamente 1 a 2 M (Vajta *et al.*, 1996; Kasai, 1997; Kong *et al.*, 2000; Vajta, 2000; Lopatárová *et al.*, 2002; Papadopoulos *et al.*, 2002).

La estrategia de la vitrificación es básicamente diferente a la congelación lenta, ya que esta última intenta mantener un balance delicado entre diversos factores tales como la formación de hielo, el daño osmótico, la alteración del citoesqueleto, el efecto tóxico de los crioprotectores, las concentraciones intracelulares de electrolitos, las lesiones causadas por el frío, la fractura de la zona pelúcida, la alteración de organelas intracelulares y el contacto célula-célula (Vajta y Kuwayama, 2006).

Por el contrario, la vitrificación puede incrementar la probabilidad de algunas formas de lesión (Vajta, 2000), pero elimina totalmente los daños mecánicos causados por la formación de cristales de hielo tanto intra como extracelular, siendo ésta la mayor causa de muerte celular (Ali y Shelton, 1993a; Darvelid *et al.*, 1994; Vajta, 2000).

El incremento de la tasa de enfriamiento disminuye el daño al citoesqueleto y al contenido lipídico de la membrana; a su vez, permite un pasaje rápido a través de la zona de temperatura de peligro que oscila entre 15 y  $-5^{\circ}\text{C}$  (Kong *et al.*, 2000; Misumi *et al.*, 2003).

Un protocolo óptimo de vitrificación de embriones puede ser logrado gracias al reemplazo del agua intracelular por los crioprotectores permeables durante la equilibración y a la mínima presencia de estos crioprotectores en el citoplasma post calentamiento (Isachenko *et al.*, 2003). El enfriamiento es logrado al colocar los embriones en nitrógeno líquido, por lo tanto no se requiere de equipos costosos de congelación a tasas controladas, constituyendo un procedimiento bastante económico (Darvelid *et al.*, 1994; Vajta, 2000; Baril *et al.*, 2001; Shaw y Jones, 2003).

Adicionalmente, no se requieren habilidades especiales, pudiéndose lograr todo el proceso rápidamente (Vajta, 2000; Shaw y Jones, 2003) y ser aplicado fácilmente tanto a nivel de campo como en el laboratorio (Baril *et al.*, 2001; Aller *et al.*, 2002; Lattanzi *et al.*, 2002).

La mayoría de las publicaciones que comparan el método de congelación tradicional y la vitrificación de embriones de animales domésticos en estadios transferibles, reportan tasas iguales o mayores de sobrevivencia, después de la vitrificación (Liebermann y Tucker, 2006), proporcionando beneficios en embriones que tienen baja viabilidad post criopreservación, como los embriones producidos *in vitro* (Campos-Chillón *et al.*, 2006). Cabe resaltar que no se reporta efecto negativo peri o postnatal en becerros nacidos a partir de la transferencia de embriones vitrificados (Jacobsen *et al.*, 2003).

La combinación de varias tecnologías como la vitrificación de embriones, producidos *in vitro*, utilizando semen sexado, representa una opción valiosa para la industria ganadera en programas de expansión de rebaños (Xu *et al.*, 2006).

Sin embargo, la vitrificación no ha sido aceptada como una técnica de rutina por los practicantes de la transferencia embrionaria, debido a la diversidad de técnicas y a la falta de una tecnología estándar y probada (Vajta, 2000; Michelmann y Nayudu, 2006).

### **Antecedentes de la vitrificación**

La relevancia de la vitrificación para la criopreservación de material biológico fue sugerida inicialmente por Luyet en 1937 (citado por Kuleshova *et al.*, 2001; Liebermann *et al.*, 2002), quien aseveró que la cristalización es incompatible con los sistemas vivos y debe ser evitada siempre que sea posible. Asimismo, reseñó que era posible la criopreservación de sistemas vivos pequeños a velocidades muy altas de congelación, logrando eliminar la formación de hielo y crear en su lugar un estado vítreo o similar al vidrio.

Sin embargo, la vitrificación no fue aceptada completamente como una estrategia práctica para la criopreservación de embriones hasta muchos años después (Ali y Shelton, 1993a), cuando se catalogó como un método rápido y eficiente para la criopreservación de sistemas biológicos (Zhu *et al.*, 1993).

Al principio de la década de los 70 se logró la congelación exitosa de embriones, haciendo uso de tasas lentas de enfriamiento y calentamiento, tomándose estos parámetros como requisitos absolutos para la criopreservación de embriones, hasta que apareció la propuesta de Willadsen (1977), quien reportó una alta sobrevivencia de embriones ovinos enfriados lentamente hasta una temperatura subcero relativamente alta (-30 a -40°C), antes de ser sumergidos en nitrógeno líquido.

La contribución de Willadsen fue relevante dado que posibilitó reducir a la mitad, el tiempo requerido por el protocolo original; además, simplificó y aceleró la técnica de descongelación, siendo estas observaciones posteriormente confirmadas en embriones murinos (Whittingham *et al.*, 1979).

La publicación de un gran número de estudios de criopreservación rápida, condujo a la primera vitrificación exitosa de embriones mamíferos, haciendo uso de embriones murinos en estadio de desarrollo de ocho células utilizando una mezcla de crioprotectores compuesta por el dimetilsulfóxido, la acetamida, el propilenglicol y el polietilenglicol, denominando a esta técnica «criopreservación libre de hielo por vitrificación» (Rall y Fahy, 1985).

A partir de este logro científico, se presentaron reportes similares en distintas especies, como la primera vitrificación exitosa de embriones bovinos, la cual fue lograda usando como crioprotector una mezcla de glicerol y propanediol en altas concentraciones (Massip *et al.*, 1986).

Posteriormente, se demostró por primera vez la competencia biológica de embriones caprinos (Yuswiati y Holtz, 1990) y ovinos a la criopreservación, a través de un método de vitrificación simple y rápido (Schiewe *et al.*, 1991), lográndose en ambos casos el nacimiento de crías viables.

La primera aplicación de la vitrificación en humanos fue realizada en 1998 (Mukaida *et al.*, 1998); y más recientemente se logró la vitrificación de embriones equinos (Oberstein *et al.*, 2001).

## **Factores que intervienen en el proceso de vitrificación**

### **1. Composición de la Solución de Vitrificación**

**1.1 Solución base.** La solución de criopreservación es preparada usualmente en medios con un pH estable que oscila entre 7,2 y 7,4. Para tal fin, se usan con éxito medios de cultivo embrionarios, tales como el medio de cultivo de tejido 199 (TCM-199; Palasz y Mapletoft, 1996), el medio HEPES-buffered Ham's F-10 (h-CM; Silvestre *et al.*, 2003) y combinaciones de medios HEPES y TCM-199 (Siqueira *et al.*, 2002).

Sin embargo, el medio simple de Buffer Fosfato Salino (PBS) es el más utilizado, no presentando diferencia significativa en la tasa de reexpansión y eclosión embrionaria con el complejo medio TCM-199 (Vajta *et al.*, 1999); aunado a esto, otros autores reportan una mayor tasa de desarrollo *in vitro* en embriones vitrificados con medio a base de PBS suplementado con un medio h-CM (Silvestre *et al.*, 2003).

**1.2 Agentes crioprotectores.** Los embriones sobreviven a la vitrificación solamente cuando son suspendidos en una solución con uno o varios solutos crioprotectores (Schneider y Mazur, 1984; Leibo, 1989; Visintin *et al.*, 2002), ya que el enfriamiento a temperaturas subcero sin protección, mata a la mayoría de las células inmediatamente, debido a daños causados por el crecimiento intracelular de cristales de hielo (Shaw y Jones, 2003).

Dicha solución crioprotectora debe vitrificar a una tasa repetible al enfriarse, permanecer vítrea al calentarse y no debe ser tóxica para los embriones durante el período de exposición antes de la vitrificación y durante el calentamiento (Ali y Shelton, 1993c).

Es necesario incluir los agentes crioprotectores en la solución de vitrificación, ya que previenen el daño celular tanto en el proceso de enfriamiento como en el de calentamiento. En general, cuando los embriones son expuestos a un crioprotector, estos inicialmente se contraen por pérdida de agua, es decir, se deshidratan debido a la hiperosmolaridad inicial de la solución extracelular, y además porque los embriones son más permeables al agua que a los crioprotectores (Schneider y Mazur, 1984; Ali y Shelton, 1993b).

Para tal fin, existen tres grupos de agentes crioprotectores. Un primer grupo conformado por crioprotectores de bajo peso molecular y permeables; entre ellos se encuentra el metanol, el etilenglicol, el propilenglicol, el dimetilsulfóxido, el 2,3 butanediol, el glicerol, y otros alcoholes.

Un segundo grupo lo conforman crioprotectores de bajo peso molecular y no permeables como la galactosa, la glucosa, la sucrosa, la trehalosa y otros azúcares.

El tercer y último grupo está constituido por crioprotectores de alto peso molecular y no permeables entre los que resaltan la polivinilpirrolidona, el

alcohol polivinílico, el hialuronidato de sodio y otros polímeros (Palasz y Mapletoft, 1996; Cabodevila y Teruel, 2001).

La presencia de crioprotectores permeables de bajo peso molecular es absolutamente necesaria durante el proceso de criopreservación (Palasz y Mapletoft, 1996). La mayoría de éstos, son capaces de penetrar al embrión a temperatura ambiente o superiores, siendo su penetración parcial, requisito indispensable para su protección (Leibo, 1989).

Sin embargo, la penetración completa del crioprotector dentro de la célula no es necesaria, ya que puede provocar toxicidad química y daño osmótico (Rall, 1987).

Para alcanzar la vitrificación a ciertas velocidades de enfriamiento, la concentración de los solutos requerida debe ser alta, por lo tanto, la toxicidad de los solutos es de gran importancia (Palasz y Mapletoft, 1996).

La embriotoxicidad puede ser bioquímica (causante de desnaturalización enzimática) o por estrés osmótico, siendo afectadas ambas formas de toxicidad por la concentración de los crioprotectores y por su tasa de permeabilidad (Ali y Shelton, 1993a,c).

El crioprotector etilenglicol es más permeable al embrión que el propilenglicol y éste a su vez es más permeable que el glicerol. Este orden se relaciona inversamente con la embriotoxicidad, lo cual es una evidencia de la relación de los componentes bioquímicos con la embriotoxicidad de los crioprotectores (Ali y Shelton, 1993c).

En pruebas de vitrificación, se evidenció que el etilenglicol vitrificó a una concentración de  $6,5\text{molL}^{-1}$ , el metanol no vitrificó a 99,8% de concentración, el dimetilsulfóxido y el glicerol vitrificaron a  $5,0\text{ mol L}^{-1}$ , el propilenglicol vitrificó a  $4,0\text{ mol L}^{-1}$  y por último el butilenglicol vitrificó a  $3,0\text{ mol L}^{-1}$ . Como se observa, existen considerables diferencias entre las distintas molaridades a las cuales los crioprotectores son vitrificados (Shaw y Jones, 2003).

Una tasa aceptable de vitrificación puede ser obtenida con altas concentraciones de un solo crioprotector, pero estas concentraciones son frecuentemente tóxicas para los embriones (Ali y Shelton, 1993c). El desafío, entonces, es encontrar solutos o una mezcla de solutos que permita obtener una solución vitrificable y que no sea tóxica a las células (Palasz y Mapletoft, 1996).

Generalmente, mezclas de crioprotectores vitrifican a concentraciones bajas, siendo así probablemente menos tóxicas. La ventaja en el uso de mezclas crioprotectoras es que se combinan las propiedades vitrificantes de un crioprotector con la baja toxicidad de otro (Ali y Shelton, 1993c).

En una serie de estudios (Yang *et al.*, 1992; Donnay *et al.*, 1998; López-Béjar y López-Gatius, 2002) han seleccionado la mezcla de etilenglicol y glicerol como la adecuada para la vitrificación.

En tal sentido, Donnay *et al.* (1998), compararon distintas concentraciones de estos crioprotectores en blastocitos bovinos producidos *in vitro*, en los cuales se obtuvo muy baja sobrevivencia (5%), posterior a la vitrificación, cuando se usó la mezcla de 10% de glicerol y 40% de etilenglicol, comparada con la tasa de sobrevivencia del 45% cuando se usó la mezcla de 25% de glicerol y 25% de etilenglicol.

Se ha demostrado que los blastocitos bovinos son más permeables a altas concentraciones de etilenglicol que de glicerol, la concentración intracelular de etilenglicol aumenta muy rápidamente debido a su bajo peso molecular lo cual podría tornarse tóxico (Donnay *et al.*, 1998).

En otro estudio, al evaluar la viabilidad *in vivo* de embriones de conejo post vitrificación, de igual forma la mezcla con 25% de glicerol más 25% de etilenglicol presentó un porcentaje mayor de nacimientos (42,7%; 59 de 138), al compararlo con el 40,7% (57 de 140) logrado con la solución de vitrificación compuesta por 4,5 M de etilenglicol más 0,25 M de sucrosa (López-Béjar y López-Gatius, 2000).

En el caso de la adición a la solución de vitrificación de agentes crioprotectores no permeables como los polímeros y los sacáridos, se ha reseñado que además de reducir la concentración intracelular de etilenglicol a temperatura ambiente (Donnay *et al.*, 1998), mejora la tasa de sobrevivencia de embriones bovinos vitrificados, independientemente del estadio de desarrollo que presenten (Saito *et al.*, 1994).

La sucrosa confiere un efecto protector adicional, ya que este crioprotector, no permeable, causa una deshidratación al embrión, con lo cual se reduce la probabilidad de formación de hielo intracelular, concentrando macromoléculas en el citoplasma y facilitando la vitrificación intracelular (Martínez *et al.*, 2002).

Azúcares como la dextrosa y la sucrosa previenen la penetración excesiva de otros crioprotectores al embrión, a través de una penetración ligera de estos sacáridos a la célula a la vez que ocasionan contracción celular (Saito *et al.*, 1994).

El uso de bajas concentraciones de sucrosa (0,1 y 0,3 M), tiene un efecto positivo sobre la tasa de eclosión de embriones bovinos producidos *in vitro*, obteniéndose un 66,3% (80 de 120) y 60,0% (72 de 120), respectivamente, en contraste con 45,8% (55 de 120) al no adicionar sucrosa y 45% (54 de 120) al aumentar la concentración de sucrosa a 0,5 M.

Solamente el uso de bajas concentraciones de sucrosa (0,1 y 0,3 M) tiene un efecto positivo, mientras que altas concentraciones (0,5 M) resultan en una tasa de eclosión más baja. Asimismo, al comparar las tasas de nacimiento, la solución de vitrificación contentiva de 0,1 M de sucrosa (50%; 20 de 40) superó el número de becerros nacidos al obtenido cuando se utilizó la solución con 0,3 M de sucrosa (40%; 16 de 40; Martínez *et al.*, 2002).

En otro estudio en el cual la solución de vitrificación estuvo compuesta de una mezcla de glicerol, etilenglicol, polietilenglicol y sacáridos como la sucrosa y la xilosa, en tres pasos para equilibrar, los embriones bovinos producidos *in vivo* presentaron 83,3% y 50% de reexpansión y eclosión *in vitro*, respectivamente (Dürr *et al.*, 2002).

## 2. Técnicas de Vitrificación

Desde el inicio de la vitrificación de embriones mamíferos, se ha podido evidenciar una creciente variedad de técnicas, que han surgido en la búsqueda de mejores niveles de sobrevivencia embrionaria, a través de una reducción considerable del volumen de solución de vitrificación y aumentando las tasas de enfriamiento.

Los primeros estudios fueron realizados utilizando pajuelas de 250 mL en su tamaño original, en este caso los embriones, luego del equilibrio, eran aspirados al interior de la pajuela con solución crioprotectora, separando este compartimiento de dos compartimientos vecinos que contenían la misma solución, por dos burbujas de aire, lográndose la vitrificación por la inmersión directa en nitrógeno líquido. Con esta técnica se obtuvo un 57% (20 de 35) de reexpansión *in vitro* en embriones bovinos (Van der Zwalmen *et al.*, 1989).

Existen variaciones con respecto al llenado de la pajuela. En algunos casos la columna de solución de aproximadamente 15 mL contentiva del embrión, es separada igualmente por dos burbujas de aire, pero esta vez se rodea de solución de dilución, es decir, una solución encargada de la remoción de los crioprotectores.

Al cuantificar tasas de viabilidad seguida de la transferencia de embriones bovinos producidos *in vivo* a vacas receptoras, de un total de 23 embriones (mórula, blastocito temprano y blastocito) con características morfológicas normales, se reporta 38% de preñez (5 de 13) en el grupo de embriones en estadio de desarrollo de mórula y blastocito temprano y 40% de preñez (4 de 10) en el grupo de blastocito.

El uso de la dilución inmediatamente posterior al calentamiento reduce considerablemente el tiempo de exposición de los embriones a las soluciones altamente concentradas de agentes crioprotectores (Ishimori *et al.*, 1993).

Es muy frecuente el uso de la pajuela de 250mL, y aunque ha sido desarrollada para congelación lenta, no es la ideal para vitrificación. La pared de la pajuela está hecha de un material plástico termo aislante, relativamente grueso, que debido a su diámetro interno ancho, puede almacenar un volumen considerablemente alto (Vajta *et al.*, 1997a), limitando la tasa de enfriamiento y calentamiento a un mínimo de 2000°C /min (Vajta *et al.*, 1998a).

Haciendo uso de estas pajuelas es muy difícil establecer un contacto directo entre la solución que contiene el embrión y el nitrógeno líquido. Por otra parte, al sumergir la columna de líquido a través de la punta abierta de la pajuela se derramará antes de solidificarse, siendo el sellado de la pajuela un proceso que consume tiempo, además de aislar la solución que contiene el embrión herméticamente como en un contenedor termo aislante (Vajta *et al.*, 1997a).

Sabiendo que uno de los obstáculos en la técnica de vitrificación de embriones, es la insuficiente tasa de enfriamiento, se han desarrollado procedimientos alternativos para contrarrestar esta situación, los cuales proponen el uso de volúmenes muy bajos de solución (Dinnyés *et al.*, 2000), y se permite un contacto directo entre el medio que contiene el embrión y el nitrógeno líquido, incrementando de esta manera la tasa de enfriamiento y calentamiento (Vajta *et al.*, 1998a).

Entre las técnicas desarrolladas se encuentra el «cryoloop», el cual consiste en un lazo de nylon (0,5 a 0,7 mm de diámetro) adosado a la tapa de un vial de congelación (Lane *et al.*, 1999).

Mientras los embriones son expuestos a las soluciones crioprotectoras, el «cryoloop» es sumergido en la solución crioprotectora, creando una película delgada en el lazo de nylon. Luego, los embriones son capturados en dicha

película y transferidos hasta el vial, el cual ha sido sumergido y llenado previamente con nitrógeno líquido (Lane *et al.*, 1999).

Por medio de esta técnica Mukaida *et al.* (2003) reportan 79% de sobrevivencia post vitrificación en blastocitos humanos, mientras Lane *et al.* (1999) reseñan 73,3% de blastocitos humanos eclosionados en cultivo *in vitro* y 95,5% en la especie murina.

La vitrificación mediante el método «*cryoloop*» aventaja los procedimientos convencionales de vitrificación por ser un sistema carente de capa termo aislante, aunado a un volumen menor a 1mL de solución de vitrificación, ocurriendo un intercambio de calor uniforme y rápido durante el enfriamiento (Lane *et al.*, 1999). Posteriormente, se han publicado nuevas variantes de esta técnica, denominando a la nueva versión «*cryoloop-straw*», con la cual se han reportado resultados similares a las obtenidos con la técnica «*cryoloop*» convencional (Takagi *et al.*, 2002).

Una tercera técnica de vitrificación denominada vitrificación en superficie sólida (*solid surface vitrification*; SSV), permite combinar las ventajas del uso de microgotas como envase de vitrificación y el alto intercambio de calor logrado por una superficie metálica precongelada (Vajta y Kuwayama, 2006).

Luego de la equilibración, grupos de 5 a 10 embriones son colocados en pequeñas gotas de solución de vitrificación sobre la superficie de un cubo de acero el cual está cubierto con una hoja de aluminio y congelado a una temperatura que oscila entre -150 y -180°C, debido a una inmersión parcial en nitrógeno líquido. Las gotas varían de tamaño entre 1 y 2 µL, logrando ser vitrificadas instantáneamente, sin tener contacto directo con el nitrógeno líquido. Dichas gotas vitrificadas son depositadas en recipientes de 1 mL para su almacenamiento a largo plazo (Dinnyés *et al.*, 2000; Vajta y Kuwayama, 2006).

En tal sentido, Bagis *et al.* (2002) reseña 21% (97 de 457) de nacimientos, provenientes de embriones murinos sometidos a la técnica de vitrificación en superficie sólida.

Una cuarta técnica de vitrificación llamada pajuela estirada abierta (*open pulled straw*; OPS) fue desarrollada por el Dr. Gabor Vajta, en 1997, la cual sugiere que la vía para incrementar la tasa de enfriamiento y calentamiento consiste en reducir el volumen de la solución, permitiendo a su vez un contacto directo (sin una capa termo aislante), entre la solución y el material congelante (Vajta *et al.*, 1997a).

En la técnica OPS, los embriones son almacenados en un tubo plástico muy delgado siendo el volumen aproximado de solución crioprotectora de 1 mL, y al dejar abierto el final de la pajuela, se logran tasas de enfriamiento de aproximadamente 20000°C/min (Vajta, 2000).

Esta técnica descrita por Vajta *et al.* (1997a), consiste en calentar suavemente las pajuelas de 250mL sobre una plancha, a una temperatura promedio de 140°C, logrando ser estiradas manualmente hasta que el diámetro interno y el espesor de la pared disminuyan de 1,7 mm aproximadamente a 0,8 mm, y de 0,15 mm aproximadamente a 0,07 mm, respectivamente. Las pajuelas son enfriadas al aire y cortadas en el punto más angosto con una hojilla.



El llenado de la pajuela se realiza colocando el final angosto en la solución, y por capilaridad los embriones ascienden en una columna líquida de 2 a 3 mm de largo (1 a 1,5 mL de volumen). Por último, la pajuela se introduce en dirección vertical dentro del nitrógeno líquido (Vajta *et al.*, 1997a).

Las pajuelas estiradas ofrecen muchas ventajas, entre las que resaltan: a) el espesor de la pared se disminuye y con eso el efecto termo aislante; b) el diámetro interno es pequeño, siendo reducido el volumen de la columna de líquido; c) el efecto de capilaridad se incrementa realizándose el llenado de la pajuela fácil y rápido; d) como resultado del efecto de capilaridad, la columna de líquido está en una posición estable al final de la pajuela y no se mueve durante la inmersión en nitrógeno líquido, por lo tanto, el contacto directo entre el nitrógeno líquido y la solución que contiene el embrión posiblemente incrementan la rapidez del enfriamiento; e) el manejo y almacenamiento de los embriones es fácil y puede ser realizado haciendo uso de equipos tradicionales; y por último f) el calentamiento puede ser realizado por contacto directo entre el crioprotector y la solución diluyente, provocando una rehidratación inmediata (Vajta *et al.*, 1997a).

Al evaluar esta técnica de vitrificación (OPS) en embriones bovinos producidos *in vivo*, se obtuvo una tasa de reexpansión del 84,6% (33 de 39) y una tasa de eclosión del 66,6% (26 de 39; Saalfeld *et al.*, 2002), mientras que embriones bovinos producidos *in vitro* presentaron una tasa de reexpansión de 52% (27 de 52). Además, se reportó 1% (3 de 212) de fractura de zona pelúcida (Vajta *et al.*, 1997a).

El bajo porcentaje de fractura de zona pelúcida es considerado como una inesperada ventaja de la técnica OPS (Vajta *et al.*, 1997a). Este fenómeno, es común cuando los embriones son enfriados y calentados rápidamente, presentándose en un 35% al aplicar congelación convencional y en un 27% al aplicar vitrificación con pajuela de 250 mL (De Paz *et al.*, 1994; Vajta *et al.*, 1997a).

Con la técnica OPS, se incrementa notablemente la tasa de enfriamiento y calentamiento, siendo rara la aparición de fractura de zona pelúcida. Este hallazgo puede ser considerado una ventaja significativa de esta técnica (Vajta, 2000).

En las pajuelas cerradas, las burbujas de aire se contraen y expanden rápidamente en paralelo con los cambios de temperatura, dando como resultado cambios de presión y movimiento en la solución parcialmente solidificada. Usando la técnica OPS, no ocurren cambios de presión alrededor de la solución, siendo mínima la fractura de zona (Vajta *et al.*, 1997a).

En otro estudio haciendo uso de embriones caprinos criopreservados con la técnica OPS, se evidenció un 100% de receptoras gestantes y 93% de cabras paridas, reportándose 64% de sobrevivencia embrionaria ya que el número de cabritos por parto fue de 1,4. Estos valores son significativamente más altos que los obtenidos en congelación convencional (58%, 50% y 42% respectivamente; El-Gayar y Holtz, 2001).

Sin embargo, estas técnicas están basadas en el contacto directo del nitrógeno líquido y el medio crioprotector que contiene el embrión, constituyendo esto, una de las mayores limitantes para la aplicación de ciertas técnicas de vitrificación. Este contacto directo significa una probabilidad

potencial para la transmisión de agentes infecciosos, no siendo compatible con las regulaciones sanitarias (Vajta *et al.*, 1998b; Kong *et al.*, 2000; Vajta, 2000; Wu *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2002).

Bielanski *et al.* (2003), demostraron que el nitrógeno líquido contaminado puede ser una fuente potencial de infección para embrionescriopreservados, sugiriendo que el almacenamiento de germoplasma bajo nitrógeno líquido es una técnica segura con bajo riesgo de contaminación sólo cuando las pajuelas son adecuadamente selladas.

Aunado a esto, otra desventaja de la OPS es su facilidad de flotar en nitrógeno líquido complicando el almacenamiento por largos períodos cuando se utiliza el sistema tradicional «*cane/goblet*» (Kong *et al.*, 2000).

Por tales motivos, la técnica OPS a partir de su propuesta inicial en 1997, ha convivido con una serie de variantes, todas ellas sugeridas con la finalidad de aportar cambios que repercutan en una mayor eficiencia.

Entre algunas de dichas modificaciones a la técnica OPS se encuentra el uso de nitrógeno líquido filtrado (Vajta *et al.*, 1998b; López-Béjar y López-Gatius, 2002; Cho *et al.*, 2002), la técnica CPS (*close pulled straw*; Chen *et al.*, 2001), la técnica OPS modificada (mOPS; López-Béjar y López-Gatius, 2002; López-Béjar y López-Gatius, 2003), la técnica Cryotop (Kuwayama *et al.*, 2005b), la técnica SOPS (*super open pulled straw*; Isachenko *et al.*, 2005), la técnica CryoTip (Kuwayama *et al.*, 2005a), la técnica microdroplet (Misumi *et al.*, 2003) y la técnica GL-Tips (*gel-loading tips*; Tominaga, 2004).

Unido al desarrollo de técnicas de vitrificación, orientadas a incrementar las tasas de enfriamiento y calentamiento, está el desarrollo de técnicas que permitan vitrificar un número elevado de ovocitos o embriones (Vajta, 2000).

Entre ellas cabe mencionar la técnica de rejilla de cobre para microscopía electrónica, con la cual se logra vitrificar grupos de 10 a 15 estructuras (Martino *et al.*, 1996), al igual que la técnica malla de nylon, la cual posee un tamaño de poro de 60mm, lográndose vitrificar hasta 65 estructuras en cada contenedor, la cual es fácil de manipular, simple y económica (Matsumoto *et al.*, 2001).

### 3. Equilibración

El procedimiento de equilibración constituye la exposición de los embriones a la solución de vitrificación, teniendo presente un control cuidadoso para prevenir daños debidos a toxicidad química o excesivo estrés osmótico durante la equilibración o subsiguiente dilución (Cabodevila y Teruel, 2001).

La cantidad de crioprotector en la solución de vitrificación que penetra el citoplasma del embrión, determina de un modo u otro que ocurra el daño osmótico. Aunque la penetración parcial del crioprotector resulta necesaria para una criopreservación exitosa, una completa penetración incrementa la probabilidad de injuria debido a una toxicidad química o a un excesivo aumento de volumen osmótico durante la dilución (Gordon, 1996).

Una estrategia para controlar la penetración del crioprotector y producir el grado necesario de deshidratación citoplasmática es el uso de un procedimiento de equilibración a manera de pasos (Rall, 1987). En tal sentido, se han desarrollado protocolos incorporando desde uno hasta cuatro pasos de equilibración.

Aunque se han desarrollado equilibraciones en un paso, se han obtenido bajas tasas de sobrevivencia *in vitro* (13,3%) en embriones ovinos producidos *in vivo* vitrificados con una solución compuesta por 5,5 M de etilenglicol más 1,0 M de sucrosa (Boggio y Caorsi, 2002); resultados similares fueron obtenidos con la mezcla de etilenglicol y glicerol (Ali y Shelton, 1993b).

En cambio, en embriones bovinos producidos *in vitro*, se lograron tasas superiores de reexpansión (58%) y eclosión (19%) haciendo uso de una solución compuesta por 40% de etilenglicol, 18% de ficol y 10,26% de sucrosa. Dichas tasas fueron significativamente superadas por la exposición a la misma solución crioprotectora en dos pasos, lográndose post vitrificación, tasas de reexpansión de 75% y de eclosión de 38% (Mahmoudzadeh *et al.*, 1995).

Al incrementar el número de pasos de la equilibración a tres, se expusieron en el primer paso grupos de 10 embriones a una solución al 10% de glicerol durante 5 min; con igual tiempo de duración, el paso dos consistió en la exposición a 10% de glicerol más 20% de etilenglicol, y como tercer y último paso, se expusieron los embriones a una solución al 25% de glicerol y 25% de etilenglicol sólo por 30 seg.

En embriones bovinos producidos *in vitro* se obtuvo 67% de sobrevivencia y 53% de eclosión (Donnay *et al.*, 1998); reportándose con un procedimiento similar, en otro estudio 72,5% (87 de 120) de sobrevivencia y 45,8% (55 de 120) de eclosión (Martínez *et al.*, 2002).

Con menor frecuencia son realizadas equilibraciones en cuatro pasos. En un ensayo comparando este procedimiento con un protocolo de dos pasos, se obtuvo una tasa más alta de sobrevivencia y eclosión de embriones bovinos producidos *in vitro* en cuatro pasos, que la de embriones expuestos a dos pasos (81,3% y 80,2% *versus* 67,6% y 71,5%; Mtango *et al.*, 2001).

Una segunda variable reseñada durante el período de equilibración es su duración. La duración de exposición de los embriones a temperatura pre vitrificación está inversamente relacionada a la tasa de enfriamiento (Ali y Shelton, 1993c).

Una estrategia para evitar la toxicidad de la solución de vitrificación consiste en acortar el tiempo de exposición de los embriones a la solución. Sin embargo, si la exposición es demasiado corta, la penetración del crioprotector podría no ser lo suficiente, y causar formación de hielo intracelular aún existiendo ausencia de hielo extracelular. Por lo tanto, el tiempo óptimo de exposición para una vitrificación exitosa debe ser intermedio, con el fin de prevenir el daño osmótico y la formación de hielo intracelular (Kasai, 1996).

Se han vitrificado exitosamente mórulas murinas después de la exposición a una mezcla de crioprotectores conteniendo etilenglicol, ficol y sucrosa en un rango amplio de tiempo de exposición (3 seg a 5 min), esto contrasta con resultados obtenidos en estudios anteriores donde con soluciones de alta toxicidad contentivas de dimetilsulfóxido, acetamida y propilenglicol, los embriones solamente pueden sobrevivir aproximadamente 10 seg de exposición (Kasai, 1996).

Una tercera variable estudiada durante el proceso de equilibración es la temperatura a la cual se realiza, ya que la penetración y toxicidad de un crioprotector está altamente influenciada por la temperatura. Una estrategia

para reducir la toxicidad es disminuir la temperatura de equilibración (Kasai, 1996).

Sin embargo, se ha demostrado que la temperatura ambiente (25 a 32°C) ha sido la más exitosa al usar mezclas de crioprotectores como etilenglicol más glicerol (Donnay *et al.*, 1998), aunque se ha logrado equilibrar satisfactoriamente en estudios más recientes embriones murinos hasta temperaturas de 37 °C (Yang *et al.*, 2006).

#### 4. Tasa de Enfriamiento

El término congelación específicamente se relaciona con la formación de cristales de hielo, mientras que bajo condiciones de vitrificación donde no existe la formación de estos cristales, el término enfriamiento es el más adecuado (Shaw y Jones, 2003).

El incremento de las tasas de enfriamiento durante la vitrificación mejora la sobrevivencia del embrión (Hredzak *et al.*, 2006); sin embargo, cuando los embriones mamíferos criopreservados son extraídos del nitrógeno líquido, ocasionalmente algunos son encontrados con fractura de zona pelúcida. La ruptura física de la zona pelúcida es causada por un estrés mecánico producido por los cambios de volumen no uniformes de la solución de vitrificación, siendo factible su ocurrencia durante cambios rápidos de temperatura (Kasai *et al.*, 1996).

Si el daño físico es limitado a la zona pelúcida, en algunas especies como la murina esos embriones pueden sobrevivir, pero una zona pelúcida intacta es benéfica para la prevención de infecciones durante la transferencia de los embriones (Kasai *et al.*, 1996).

Enfriamientos ultra rápidos no proveen el tiempo suficiente para los procesos cinéticos que son necesarios para la formación y crecimiento espontáneo de núcleos de hielo en soluciones acuosas. Los cálculos sugieren que tasas de enfriamiento aproximadas de  $10^7$  °C /seg son necesarias para vitrificar agua pura y soluciones acuosas diluidas (Rall, 1987).

La tasa de enfriamiento lograda con la técnica OPS es de 22500°C/min (Vajta *et al.*, 1998a), en comparación con 2550°C/min logrados con la pajuela de 250 µL (Lopatárová *et al.*, 2002).

Las fracturas ocurren cuando soluciones de altas concentraciones, son enfriadas rápidamente al sumergirlas abruptamente en nitrógeno líquido. En contraste, en una solución de similares concentraciones, raramente la zona pelúcida se fractura cuando se enfría en los vapores del nitrógeno líquido durante 2 min, seguido de la inmersión en nitrógeno líquido (Donnay *et al.*, 1998).

El enfriamiento en vapores de nitrógeno líquido durante la vitrificación debe ser considerado para prevenir fracturas en el embrión (Donnay *et al.*, 1998), lográndose una incidencia menor de daños a la zona pelúcida que en la congelación lenta (Kasai *et al.*, 1996).

#### 5. Tasa de Calentamiento

Teniendo en cuenta que la vitrificación es un proceso físico diferente al de la congelación, es necesario definir con claridad, el significado de la terminología usada al hacer referencia al tema.

Cuando se habla de llevar nuevamente el material biológico vitrificado a la temperatura ambiente del laboratorio se utiliza el término calentar y no descongelar. Por otra parte, desvitrificación no significa, como parecería, salir del estado de vitrificación para regresar a la temperatura óptima celular o corporal, sino que indica pérdida del estado vítreo pasando al de cristalización, hecho indeseable que puede ser incompatible con la viabilidad celular y embrionaria (Cabodevila y Teruel, 2001; Shaw y Jones, 2003).

El cambio de fase sólida a líquida en la solución de crioprotectores ocurre entre  $-110$  y  $-135^{\circ}\text{C}$ , la fractura de la zona pelúcida parece ocurrir en este rango de temperatura; para prevenirla se pueden pasar los embriones moderadamente a través de esta temperatura, manteniendo la pajuela en el aire a temperatura ambiente antes de un rápido calentamiento (inmersión en agua a  $25^{\circ}\text{C}$ ), logrando embriones sin daño en la zona pelúcida y 88% (78 de 90) de sobrevivencia *in vitro* (Kasai *et al.*, 1996).

## 6. Dilución

Los crioprotectores como el glicerol y dimetilsulfóxido deben ser retirados de los embriones antes de ser transferidos, ya que una vez en contacto con los fluidos uterinos isotónicos, se produce una sobrehidratación que provoca daños celulares irreversibles, con la subsiguiente muerte embrionaria debido al *shock* osmótico consecuencia del rápido pasaje de agua hacia el interior de las células.

Este *shock* osmótico puede ser sensiblemente reducido si se utilizan crioprotectores con altos coeficientes de permeabilidad como el etilenglicol (Larocca y Fernández, 1997).

Los embriones pueden ser diluidos a través de dos métodos, bien sea dilución dentro o fuera de la pajuela (Vajta, 2000).

Con la finalidad de determinar la tasa de preñez posterior a la transferencia entre embriones sometidos a uno u otro método de dilución, se utilizaron embriones bovinos obtenidos *in vitro* y sometidos al proceso de vitrificación publicado por Vajta *et al.* (1998a).

Para la dilución dentro de la pajuela (*in-straw dilution*) se utilizó una pajuela de 250mL conteniendo sucrosa 0,2 M, calentada a  $39^{\circ}\text{C}$  y mantenida verticalmente con el extremo abierto hacia arriba. Las pajuelas estiradas fueron sacadas del nitrógeno líquido, y el extremo angosto (conteniendo los embriones y solución) es deslizado dentro de la pajuela de 250 mL.

Luego, los embriones se sumergen en la solución de sucrosa y se retira la pajuela estirada. La pajuela de 250 mL es cargada en una pistoleta para realizar la transferencia en la receptora (Larocca y Fernández, 1997).

Para la dilución fuera de la pajuela (*ex-straw dilution*), los embriones fueron colocados en placas contentivas de sucrosa 0,2 M, luego de 5 min se trasladaron a una solución de 0,1 M de sucrosa por 5 min, seguido de dos lavados en medio de mantenimiento, colocando los embriones en pajuelas de 250mL para su posterior transferencia (Larocca y Fernández, 1997).

El porcentaje de receptoras gestantes, diagnosticadas ultrasonográficamente, fue de 64% (7 de 11) para el método de dilución dentro de la pajuela y 40% (4 de 10) para el método de dilución fuera de la pajuela (Lewis *et al.*, 1999).

También se han logrado tasas de reexpansión *in vitro* de 86% con embriones bovinos producidos *in vitro* para el método de dilución dentro de la pajuela (Vajta *et al.*, 1997b). Estos datos indican que la vitrificación puede ser combinada con el método de dilución dentro de la pajuela para alcanzar tasas de preñez aceptables con embriones bovinos producidos *in vitro* (Lewis *et al.*, 1999); sin embargo, esta metodología no ha tenido mucha aceptación en la industria de la transferencia de embriones posiblemente por la complejidad del proceso de ensamblaje de las pajuelas o por la falta de resultados consistentes (Larocca y Fernández, 1997).

## CONCLUSIONES

La aplicación y desarrollo de la vitrificación representa una alternativa competitiva para la criopreservación de embriones, afirmación reseñada por autores como Dobrinsky (2002) y Papadopoulos *et al.* (2002), ya que simplifica y acelera considerablemente el proceso de criopreservación sin requerir de costosos equipos (Dattena *et al.*, 2000; Lopatárova *et al.*, 2002). Esta técnica elimina la formación de cristales de hielo, una de las causas más peligrosas de daño celular post criopreservación (Vajta y Kuwayama, 2006), a su vez no altera el consumo de glucosa y piruvato por el embrión (Kaidi *et al.*, 2001). Por tales motivos, se considera una técnica práctica y eficiente para la criopreservación de embriones y fundamental para el uso de la transferencia de embriones (Martínez *et al.*, 2002).

En tal sentido, todos los estudios de criobiología tanto en embriones de animales de laboratorio como de animales de granja realizados fuera de nuestras fronteras, avalan la aplicabilidad potencial, a nivel nacional, de la técnica novedosa de vitrificación, logrando un aporte para la incorporación en nuestro país de biotecnologías avanzadas aplicadas a la reproducción y proporcionando una vía opcional de preservación de embriones con porcentajes óptimos de viabilidad, siendo además una técnica sencilla, de fácil ejecución y costo-eficiente.

## REFERENCIAS

1. Ali, J.; Shelton, J.N. 1993a. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98: 459-465.
2. Ali, J.; Shelton, J.N. 1993b. Successful vitrification of day-6 sheep embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99: 65-70.
3. Ali, J.; Shelton, J.N. 1993c. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99: 471-477.
4. Aller, J.F.; Rebuffi, G. E.; Cancino, A. K.; Alberio, R.H. 2002. Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. *Animal Reproduction Science*, 73:121-127.

5. Bagis, H.; Odaman, H.; Sagirkaya, H.; Dinnyés, A. 2002. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 61:173-179.
6. Baril, G.; Traldi, A.L.; Cognié, Y.; Leboeuf, B.; Beckers, J. F.; Mermillod, P. 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56:299-305.
7. Bielanski, A.; Bergeron, H.; Lau, P.C.K.; Devenish, J. 2003. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 46: 146-152.
8. Boggio, J.C.; Caorsi, C.A. 2002. Survival of ovine embryos vitrified in 5,5 M ethyleneglycol + 1,0M sucrose or 1,0 M trehalose. First report in Uruguay. *Theriogenology*, 57:462 (Abstr.).
9. Cabodevila, J.; Teruel, M. 2001. Criopreservación de embriones bovinos. En: *Biotechnología de la Reproducción*. (G.A. Palma, eds.). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina. Capítulo X, pp. 149-174.
10. Campos-Chillón, L.F.; Walker, D.J.; de la Torre-Sánchez, J.F.; Seidel, G.E. 2006. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology*, 65:1200-1214.
11. Chen, S.U.; Lien, Y.R.; Cheng, Y.Y.; Chen, H.F.; Ho, H.N.; Yang, Y.S. 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. *Human Reproduction*, 16:2350-2356.
12. Cho, S.K.; Cho, S.G.; Bae, I.H.; Park, C.S.; Kong, I.K. 2002. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Animal Reproduction Science*, 73:151-158.
13. Darvelid, B.U.; Gustafsson, H.; Shamsuddin, M.; Larsson, B.; Rodriguez-Martinez, H. 1994. Survival rate and ultrastructure of vitrified bovine *in vitro* and *in vivo* developed embryos. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 35:417-426.
14. Dattena, M.; Ptak, G.; Loi, P.; Cappai, P. 2000. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, 53:1511-1519.
15. De Paz, P.; Sánchez, A.J.; Fernández, J.G.; Carbajo, M.; Domínguez, J.C.; Chamorro, C.A.; Anel, L. 1994. Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing. *Theriogenology*, 42:327-338.
16. Dinnyés, A.; Dai, Y.; Jiang, S.; Yang, X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 63:513-518.
17. Dobrinsky, J.R. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57:285-302.
18. Donnay, I.; Auquier, P.; Kaidi, S.; Carolan, C.; Lonergan, P.; Mermillod, P.; Massip, A. 1998. Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Animal Reproduction Science*, 52: 93-104.

19. Dürr, G.C.; Pegoraro, L.M.C.; Coscioni, A.C.; Anghinoni, L.B.; Saalfeld, M.H.; Fischer, V. 2002. *In vitro* survival of vitrified Jersey embryos. *Theriogenology*, 57:463 (Abstr.).
20. El-Gayar, M.; Holtz, W. 2001. Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *Journal of Animal Science*, 79:2436-2438.
21. Gordon, I. 1996. Transferencia de embriones y técnicas asociadas en el ganado vacuno. En: *Reproducción controlada del ganado vacuno y búfalos* (I. Gordon, eds.). Acribia, Zaragoza, España, Capítulo 7, pp. 255-385.
22. Hredzak, R.; Ostro, A.; Zdilova, V.; Maracek, I.; Kacmarik, J. 2006. Survival of mouse embryos after vitrification depending on the cooling rate of the cryoprotectant solution. *Acta Veterinaria Hungarica*, 54:117-125.
23. Isachenko, V.; Folch, J.; Isachenko, E.; Nawroth, F.; Krivokharchenko, A.; Vajta, G.; Dattena, M.; Alabart, J. 2003. Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. *Theriogenology*, 60:445-452.
24. Isachenko, V.; Montag, M.; Isachenko, E.; Zaeva, V.; Krivokharchenko, I.; Shafei, R. 2005. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open pulled straw. *Human Reproduction*, 20:492-496.
25. Ishimori, H.; Saeki, K.; Inai, M.; Nagao, Y.; Itasaka, J.; Miki, Y.; Seike, N.; Kainuma, H. 1993. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, 40:427-433.
26. Jacobsen, H.; Holm, P.; Schmidt, M.; Avery, B.; Greve, T.; Callesen, H. 2003. No peri- and postnatal effects on calves born after transfer of *in vitro* produced embryos vitrified by the open pulled straw (OPS) method. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44: 87-95.
27. Kaidi, S.; Bernard, S.; Lambert, P.; Massip, A.; Dessy, F.; Donnay, I. 2001. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 65:1127-1134.
28. Kasai, M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Animal Reproduction Science*, 42:67-75.
29. Kasai, M. 1997. Cryopreservation of mammalian embryos. *Molecular Biotechnology*, 7: 173-179.
30. Kasai, M.; Zhu, S.E.; Pedro, P.B.; Nakamura, K.; Sakurai, T.; Edashige, K. 1996. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology*, 33:459-464.
31. Kong, I.K.; Lee, S.I.; Cho, S.G.; Cho, S.K.; Park, C.S. 2000. Comparison of open pulled straw (OPS) vs. glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*, 53:1817-1826.
32. Kuleshova, L.L.; Shaw, J.M.; Trounson, A.O. 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 43:21-31.
33. Kuwayama, M.; Vajta, G.; Ieda, S.; Kato, O. 2005a. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the



- elimination of potential contamination. *Reproductive Biomedicine online*, 11:608-614.
34. Kuwayama, M.; Vajta, G.; Kato, O.; Leibo, S.P. 2005b. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive Biomedicine online*, 11:300-308.
  35. Lane, M.; Schoolcraft, W.B.; Gardner, D.K. 1999. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*, 72:1073-1078.
  36. Larocca, C.E.; Fernández, A. 1997. Congelación de embriones bovinos con etilenglicol vs. glicerol. *Archivos de Zootecnia*, 46:295-300.
  37. Lattanzi, M.; Santos, C.; Chaves, G.; Miragaya, M.; Capdevielle, E.; Judith, E.; Agüero, A. and Baranao, L. 2002. Cryopreservation of Llama (*Lama glama*) embryos by slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 57:585 (Abstr.).
  38. Leibo, S.P. 1989. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 31:85-93.
  39. Lewis, I.M.; Lane, M.W.; Vajta, G. 1999. Pregnancy rates following transfer of *in vitro* produced bovine embryos vitrified by the open pulled straw (OPS) method. *Theriogenology*, 51:168 (Abstr.).
  40. Liebermann, J.; Nawroth, F.; Isachenko, V.; Isachenko, E.; Rahimi, G.; Tucker, M.J. 2002. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of Reproduction*, 67:1671-1680.
  41. Liebermann, J.; Tucker, M.J. 2006. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertility and Sterility*, 86:20-26.
  42. Lopatárová, M.; Cech, S.; Havlíček, V.; Holý, L. 2002. Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine embryos from superovulated cows. *Acta Veterinaria Brunensis*, 71:93-99.
  43. López-Béjar, M.; López-Gatius, F. 2000. *In vitro* and *in vivo* survival of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 53:259 (Abstr.).
  44. López-Béjar, M.; López-Gatius, F. 2002. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology*, 58:1541-1552.
  45. López-Béjar, M.; López-Gatius, F. 2003. Corrigendum to «Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure». *Theriogenology*, 60:789-790.
  46. Mahmoudzadeh, A.R.; Van Soom, A.; Bols, P.; Ysebaert, M.T.; De Kruif, A. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro*: Effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *Journal of Reproduction and Fertility*, 103:33-39.
  47. Martínez, A.G.; Valcárcel, A.; de las Heras, M.A.; de Matos, D.G.; Furnus, C.; Brogliatti, G. 2002. Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Animal Reproduction Science*, 73:11-21.
  48. 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.

49. Massip, A.; Van der Zwalm, P.; Scheffen, B.; Ectors, F. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo letter*, 7:270-273.
50. Matsumoto, H.; Jiang, J.Y.; Tanaka, T.; Sasada, H.; Sato, E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, 42:139-144.
51. Michelmann, H.W.; Nayudu, P. 2006. Cryopreservation of human embryos. *Cell Tissue Bank*, 7:135-141.
52. Misumi, K.; Suzuki, M.; Sato, S.; Saito, N. 2003. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology*, 60:253-260.
53. Mtango, N.R.; Varisanga, M.D.; Dong, Y.J.; Otoi, T.; Suzuki, T. 2001. The effect of prefreezing the diluent portion of the straw in a step-wise vitrification process using ethylene glycol and polyvinylpyrrolidone to preserve bovine blastocysts. *Cryobiology*, 42:135-138.
54. Mukaida, T.; Wada, S.; Takahashi, K.; Pedro, P.B.; An, T.Z.; Kasai, M. 1998. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Human Reproduction*, 13:2874-2879.
55. Mukaida, T.; Takahashi, K.; Kasai, M. 2003. Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. *Reproductive Biomedicine online*, 6:221-225.
56. Oberstein, N.; O'Donovan, M. K.; Breummer, J.E.; Seidel, G.E.Jr.; Carnevale, E.M.; Squires, E.L. 2001. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, 55:607-613.
57. Palasz, A.T.; Mapletoft, R.J. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14:127-149.
58. Papadopoulos, S.; Rizos, D.; Duffy, P.; Wade, M.; Quinn, K.; Boland, M.P.; Lonergan, P. 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Animal Reproduction Science*, 74:35-44.
59. Rall, W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24:387-402.
60. Rall, W.F.; Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*. 313:573-575.
61. Saalfeld, M.H.; Durr, G.C.; Pegoraro, L.M.; Vetromila, M.A.; Rhneingantz, M.G.; Anghinoni, L.B.; Pivato, I.; Vajta, G. 2002. Vitrification of embryos from Jersey cows by the OPS procedure. *Theriogenology*, 57:566 (Abstr.).
62. Saito, N.; Imai, K.; Tomizawa, M. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1053-1060.
63. Schiewe, M.C.; Rall, W.F.; Stuart, L.D.; Wildt, D.E. 1991. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. *Theriogenology*, 36:279-293.

64. Schneider, U.; Mazur, P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 21:68-79.
65. Shaw, J. M.; Jones, G.M. 2003. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 9:583-605.
66. Silvestre, M.A.; Saeed, A.M.; Escribá, M.J.; García-Ximénez, F. 2003. Vitrification of *in vitro* cultured rabbit morulae. *Animal Reproduction Science*, 76:113-124.
67. Siqueira, E.S.C.; Ponchirolli, C.B.; Fernandes, C.B.; Landim-Alvarenga, F.C. 2002. Vitrification of bovine oocytes in presence of follicular fluid using open pulled straws. *Theriogenology*, 57:482 (Abstr.).
68. Takagi, Y.; Sakamoto, M.; Yamaguchi, S.; Ota, K.; Jindo, M. 2002. Vitrification of mouse blastocysts by the cryoloop-straw method. *Theriogenology*, 57:484 (Abstr.).
69. Tominaga, K. 2004. Cryopreservation and sexing of *in vivo* – and *in vitro* – produced bovine embryos for their practical use. *Journal of Reproduction and Development*, 50:29-38.
70. Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 60-61:357-364.
71. Vajta, G.; Booth, P.J.; Holm, P.; Greve, T.; Callesen, H. 1997a. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-letters*, 18: 191-195.
72. Vajta, G.; Holm, P.; Greve, T.; Callesen, H. 1996. Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Animal Reproduction Science*, 45:191-200.
73. Vajta, G.; Holm, P.; Greve, T.; Callesen, H. 1997b. Comparison of two manipulation methods to produce *in vitro* fertilized, biopsied and vitrified bovine embryos. *Theriogenology*, 47:501-509.
74. Vajta, G.; Kuwayama, M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65:236-244.
75. Vajta, G.; Lewis, I.M.; Kuwayama, M.; Greve, T.; Callesen, H. 1998a. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 51:53-58.
76. Vajta, G.; Lewis, I.M.; Kuwayama, M.; Greve, T.; Callesen, H. 1998b. Sterile application of the open pulled straw (OPS) vitrification method. *Cryo-Letters*, 19:389-392.
77. Vajta, G.; Rindom, N.; Peura, T.T.; Holm, P.; Greve, T.; Callesen, H. 1999. The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, 52:939-948.
78. Van der Zwalm, P.; Touati, K.; Ectors, F.J.; Massip, A.; Beckers, J.F.; Ectors, F. 1989. Vitrification of bovine blastocysts. *Theriogenology*, 31:270 (Abstr.).
79. Visintin, J.A.; Martins, J.F.P.; Bevilacqua, E.M.; Mello, M.R.B.; Nicasio, A.C.; Assumpção, M.E.O.A. 2002. Cryopreservation of *Bos taurus* vs.

- Bos indicus* embryos: are they really different?. *Theriogenology*, 57:345-359.
80. Whittingham, D.G.; Wood, M.; Farrant, J.; Lee, H.; Halsey, J.A. 1979. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196 degrees C. *Journal of Reproduction and Fertility*. 56:11-21.
  81. Willadsen, S.M. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during-freezing and thawing. *Ciba Found Symp*. 52:175-201.
  82. Wu, J.; Zhang, L.; Wang, X. 2001. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction*, 121:389-393.
  83. Xu, J.; Guo, Z.; Su, L.; Nedambale, T.L.; Zhang, J.; Schenk, J.; Moreno, J.F.; Dinnyes, A.; Ji, W.; Tian, X. C.; Yang, X.; Du, F. 2006. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. *Journal of Dairy Science*, 89:2510-2518.
  84. Yang, N.S.; Lu, K.H.; Gordon, I.; Polge, C. 1992. Vitrification of bovine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 37:326 (Abstr.).
  85. Yang, Q.; Hou, Y.; Yang, Z.; Zhou, G.; Li, X.; Zhu, S. 2006 Vitrification of mouse blastocyst by open pulled straw (OPS) method at different temperature. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao*, 39: 243 (Abstr.).
  86. Yuswiati, E.; Holtz, W. 1990. Successful transfer of vitrified goat embryos. *Theriogenology*, 34:629-632.
  87. Zhu, S.E.; Kasai, M.; Otoge, H.; Sakurai, T.; Machida, T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98:139-145.