

Efecto de la concentración de crioprotectores sobre la viabilidad post vitrificación de embriones murinos (*Mus musculus*)

Effect of cryoprotectant concentration on the post vitrification morphological viability of murine embryos (Mus musculus)

María Y Martínez A¹, Pedro Cabrera T², Adriana Fernández², Thaís Díaz², Isis Vivas³, Yuraima Reyes⁴

RESUMEN

Con la finalidad de determinar la mejor solución de vitrificación (SV), usando Etilenglicol (EG), Glicerol (G) y Sucrosa (SUC), se evaluó la apariencia morfológica post vitrificación de embriones murinos (*Mus musculus*). Ocho mezclas diferentes de crioprotectores fueron evaluadas, con las siguientes concentraciones: SV1: 0% de crioprotectores; SV2: 50% EG; SV3: 50% G; SV4: 50% SUC; SV5: 25% EG + 25% G; SV6: 50% EG + 0,3M SUC; SV7: 50% G + 0,3M SUC y SV8: 25% EG + 25% G + 0,3M SUC. El mayor número de embriones (94,7%) con apariencia morfológica normal, fueron los equilibrados con SV5. No hubo diferencia significativa entre la SV8 (88,9%) y la SV5. Mientras que los embriones criopreservados con las soluciones restantes, presentaron viabilidad morfológica más baja ($p<0,05$). Estos resultados sugieren que la SV5 provee mejor tolerancia al proceso de vitrificación, observándose en los embriones la más alta viabilidad y la más baja frecuencia de anomalías morfológicas. Estos hallazgos contribuyen de manera importante, en la selección de los crioprotectores para la vitrificación.

Palabras clave: embrión, murino, crioprotectores.

SUMMARY

In order to determine the best vitrification solution (VS), using ethylene glycol (EG), glycerol (G) and sucrose (SUC), the post vitrification morphology in murine embryos (*Mus musculus*) was evaluated. Eight different mixtures of these chemicals, with the following concentrations: VS1: 0%; VS2: 50% EG; VS3: 50% G; VS4: 50% SUC; VS5: 25% EG + 25% G; VS6: 50% EG + 0.3M SUC; VS7: 50% G + 0.3M SUC and VS8: 25% EG + 25% G + 0.3M SUC, were used. VS5 was the solution with the highest percentage (94,7%) of embryos with normal morphology. There were no significant differences between the VS8 (88.9%) and VS5. However, embryos cryopreserved with the other solutions had a lower morphological viability ($p<0.05$). These results suggest that VS5 provides embryos with better tolerance to the vitrification process, because a higher viability and lower frequency of morphological abnormalities were present. These findings provide details of great importance to the selection of cryoprotectants for vitrification.

Key words: embryo, murine, cryoprotectants.

¹ Universidad de Carabobo, Sede Aragua, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Bionálisis, La Morita II, Maracay, Estado Aragua, Venezuela. Telf.: (0243) 2710520, Ext.: 115, mail: mmariaynelda@gmail.com.

² Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Estado Aragua, Venezuela. Telf.: (0243) 2464266, mail: pedro.cabrera@ucv.ve.

³ Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Cátedra de Estadística.

⁴ Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias Veterinarias, Jefe de Bioterio.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de embriones representa un procedimiento básico en las técnicas de reproducción asistida, en especies domésticas de interés económico, especies silvestres y en animales de laboratorio (1).

El procedimiento más frecuentemente utilizado para criopreservar embriones es la congelación lenta, sin embargo, han surgido nuevas alternativas de criopreservación embrionaria, como la vitrificación. Este último método de criopreservación es extremadamente rápido, en el cual los embriones son incluidos en soluciones altamente concentradas de crioprotectores y sumergidos en nitrógeno líquido, demorándose sólo unos segundos en congelarse (2). De esta manera, se logra la solidificación de la solución crioprotectora, al tomar contacto con el material congelante, debido al aumento extremo de su viscosidad, lo cual evita la formación de cristales de hielo, permitiendo que la solución cambie del estado líquido a un estado vítreo (3).

La vitrificación, como toda técnica de criopreservación consta de cinco pasos fundamentales, como son: la equilibración, el enfriamiento, el almacenamiento, el calentamiento y por último la dilución, constituyendo un proceso complejo en el cual se encuentran involucradas gran cantidad de variables (4) (5). En tal sentido, la estrategia más eficiente para mejorar los porcentajes de viabilidad embrionaria durante la vitrificación está basada en la equilibración (6), constituyendo un punto clave en todo el proceso, ya que consiste en la exposición de los embriones a los crioprotectores contenidos en la solución de vitrificación, resaltando que los embriones sobreviven a la vitrificación solamente cuando son suspendidos en una solución con uno o varios solutos crioprotectores (7).

Una tasa de vitrificación aceptable puede ser obtenida con altas concentraciones de un solo crioprotector, pero estas concentraciones son frecuentemente tóxicas para los embriones (8). El desafío, es encontrar solutos o una mezcla de solutos que permita obtener una solución vitrificable que no sea tóxica a las células (9).

A pesar de las ventajas de la vitrificación y las bondades de los crioprotectores como el etilenglicol, el glicerol y la sucrosa, en la actualidad existen abundantes diferencias entre los laboratorios a nivel mundial, con relación a las concentraciones utilizadas. Por tal motivo, el

objetivo del presente trabajo ha sido establecer las concentraciones óptimas de los crioprotectores etilenglicol, glicerol y sucrosa que garanticen la viabilidad de embriones murinos post vitrificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se escogieron ratones hembra vírgenes de la cepa NIH (*National Institute of Health*), con un rango de edad y peso entre seis a ocho semanas y 17 a 20g respectivamente. Además, fueron utilizados ratones macho de la misma cepa, con una edad promedio de ocho semanas, a los cuales previamente se les comprobó su fertilidad, mediante exposición a hembras y nacimiento de crías viables.

Grupos de ocho ratones hembra, fueron simultáneamente estimulados para cada jornada de colecta, aplicando el protocolo de superovulación de los roedores, colecta y clasificación de los embriones (10).

Experimento 1: Efecto de la solución de vitrificación sobre la viabilidad de los embriones post vitrificación.

Un total de 160 embriones murinos colectados en estadio de desarrollo de blastocito de excelente calidad y congelable, fueron expuestos a uno o a mezclas de tres tipos de crioprotectores (CP), Etilenglicol (EG), Glicerol (G) y Sucrosa (SUC). Grupos de 20 embriones fueron sometidos durante la fase de equilibración (exposición a los crioprotectores) a uno de los 8 tipos de solución de vitrificación (SV) descritos en la Tabla 1, expuestos en tres pasos, con una duración de 5min, 5min y 30s respectivamente.

Al finalizar la equilibración, los embriones se aspiraron en pajuelas mOPS (*modified open pulled straw*, pajuela plástica de 0,25µL sometida a calor para reducir su diámetro interno aproximadamente a la mitad, al ser estirada), almacenando cuatro embriones por pajuela mOPS, para un total de 40 pajuelas, cerciorándose que la columna de solución contentiva del embrión se ubicó en la porción más delgada de la pajuela, procediendo finalmente a sellar el extremo abierto con alcohol polivinílico.

Las pajuelas, en la fase de enfriamiento, se expusieron durante 5min a vapores de nitrógeno líquido, antes de ser sumergidas en el material congelante, almacenándolas durante un tiempo promedio de 4h.

Tabla 1

Concentraciones de crioprotectores de las soluciones de vitrificación de acuerdo a los pasos de equilibración

Solución de Vitrificación	Paso 1 (5 min)	Paso 2 (5 min)	Paso 3 (30 s)
SV1	0% CP	0% CP	0% CP
SV2	10% EG	30% EG	50% EG
SV3	10% G	30% G	50% G
SV4	10% SUC	30% SUC	50% SUC
SV5	10% G	20% EG; 10% G	25% EG; 25% G
SV6	10% EG	30% EG; 0,3 M SUC	50% EG; 0,3 M SUC
SV7	10% G	30% G; 0,3 M SUC	50% G; 0,3 M SUC
SV8	10% G	20% EG; 10% G; 0,3 M SUC	25% EG; 25% G; 0,3 M SUC

Durante la fase de calentamiento, la pajuela es extraída del nitrógeno líquido y mantenida durante aproximadamente 5s a temperatura ambiente.

Durante la fase de dilución (remoción de los crioprotectores), el contenido de las pajuelas se expuso a tres soluciones contentivas de concentraciones decrecientes de sucrosa (1; 0,5 y 0,25M), manteniendo los embriones sumergidos por un lapso de 5min en cada solución, tomando en cuenta en este paso, la tasa de recuperación de embriones, es decir, el número de embriones obtenidos de la pajuela en relación al número de embriones cargados en la misma, previo al enfriamiento (11).

Finalmente, luego del proceso de dilución, los embriones fueron evaluados con un microscopio invertido a una magnificación de 200X, con el objeto de determinar la tasa de sobrevivencia morfológica (12). Dicha tasa corresponde al número de embriones con todas las blastómeras morfológicamente intactas, la zona pelúcida íntegra y con re-expansión del blastocelo post vitrificación (13), todo esto con base en el número de embriones recuperados post vitrificación (14).

Asimismo, se procedió a cuantificar la presencia de anomalías morfológicas y sus tipos.

Experimento 2: Efecto de la mezcla de crioprotectores sobre la formación de cristales de hielo y resistencia a la deformación.

Con la finalidad de comprobar la capacidad que tiene la solución de vitrificación de formar cristales de hielo, se procedió a llenar una pajuela mOPS por cada una de las ocho soluciones estudiadas en el Experimento 1, observando la apariencia macroscópica de las soluciones luego de la inmersión en nitrógeno líquido, detallando la presencia o ausencia de cristales de hielo de acuerdo a la opacidad o transparencia presente en la columna de solución, respectivamente. Denominando a la solución transparente como una solución con vitrificación aparente.

Adicionalmente, dicha solución transparente con menor capacidad de formación de cristales de hielo, se le comprobó su resistencia a la deformación, procediendo a sumergir una gota de aproximadamente 200µL de dicha solución en una placa de Petri plástica con nitrógeno líquido, para realizarle presión con una pinza metálica posterior al enfriamiento, y de esta forma comprobar la consistencia de la solución ya solidificada. Se utilizó una gota de la SV1 como solución control.

Los datos obtenidos fueron analizados tanto por la prueba de proporciones como por la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, haciendo uso del Sistema de Análisis Estadístico (SAS, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se vitrificaron 160 embriones murinos, en estadio de blastocito, procesando cinco repeticiones para cada uno

de los ocho tratamientos estudiados (pajuelas conteniendo cuatro embriones).

La tasa de recuperación total fue de 90% (144/160) de los embriones inicialmente criopreservados, no variando esta tasa significativamente en las 40 pajuelas vitrificadas, corroborando el carácter repetible de la técnica.

Del total de 144 embriones recuperados, 17 fueron vitificados en ausencia de crioprotectores, mientras que 127 blastocitos fueron previamente equilibrados haciendo uso de tres distintos crioprotectores (etilenglicol, glicerol y sucrosa) antes de la vitrificación; en tal sentido, es importante resaltar la necesidad del uso de crioprotectores antes del proceso de criopreservación, ya que ningún embrión presentó características morfológicas de viabilidad (0%; 0/17) en ausencia de crioprotectores, siendo significativamente superior ($p < 0,05$), el número de embriones viables haciendo uso de estos compuestos, reportándose 60,6% (77/127) de viabilidad morfológica.

Estos valores se correlacionan con estudios anteriores realizados, quienes reportan que el enfriamiento de embriones a temperaturas bajo cero sin protección, puede destruir a la mayoría de las células debido al daño ocasionado por la formación de los cristales de hielo (5). A su vez, se reporta que el efecto protector de los agentes crioprotectores se debe a la reducción del daño ocasionado por el efecto solución y la congelación intracelular, además de la disminución de la temperatura a la cual la congelación intracelular ocurre y un efecto estabilizador de las membranas celulares (6).

Con relación a las siete soluciones de vitrificación del experimento, que contenían crioprotectores (Tabla 2); podemos reseñar que las soluciones SV2, SV3 y SV4 estaban constituidas por un solo crioprotector etilenglicol, glicerol y sucrosa, respectivamente, observándose numéricamente una mayor tasa de viabilidad embrionaria en la solución compuesta por etilenglicol, al igual que en el trabajo expuesto (15), quien al evaluar etilenglicol, dimetilsulfóxido y 1,2-propanediol obtuvo mejor resultado con el primero, ya que el etilenglicol es el crioprotector de más bajo peso molecular, más permeable y menos tóxico, entre los evaluados.

Al evaluar las soluciones formadas por mezcla de crioprotectores (SV5, SV6, SV7 y SV8), observamos que

cuando se utiliza la SV5 (25% de glicerol más 25% de etilenglicol) y SV8 (25% de glicerol, 25% de etilenglicol más 0,3M de sucrosa), se obtiene mayor número de blastocitos ($n = 18$ y 16 , respectivamente; $p < 0,05$), con apariencia morfológica normal post vitrificación, con lo cual la mezcla contribuyó a que los embriones soportaran mejor el proceso de criopreservación, obteniéndose 94,7% y 88,9% de blastocitos normales, respectivamente.

Este resultado fue similar al obtenido por los autores (16), quienes al evaluar el desarrollo *in vitro* de embriones de conejo hasta el estadio de blastocito expandido, sometidos previamente a diferentes soluciones de vitrificación, obtuvieron un porcentaje más elevado de viabilidad en los embriones sometidos a 25% de glicerol y 25% de etilenglicol (79,2%), no existiendo diferencia significativa con la solución compuesta por 4,5M de etilenglicol más 0,25M de sucrosa (76,5%), siendo estas dos soluciones superiores, entre un total de cinco mezclas de criopreservación evaluadas.

En la mayoría de las soluciones de vitrificación de embriones mamíferos, el etilenglicol es el crioprotector de elección inicial para formar la mezcla, siendo el más extensamente usado, debido a que es más permeable, menos tóxico y más efectivo (17). En la SV5 el glicerol tiene acción protectora primaria sobre la membrana citoplasmática, debido a la menor permeabilidad del glicerol; mientras que un agente más permeable como el Etilenglicol, protege las estructuras intracelulares (18).

En nuestro experimento, las tres mayores tasas de sobrevivencia morfológica fueron aquellas de los embriones sometidos a soluciones compuestas por combinación de varios crioprotectores, ya que generalmente las mezclas de crioprotectores vitrifican a bajas concentraciones, siendo así probablemente menos tóxicas (8).

Resultado similar al reportado por los autores (19), quienes vitrificaron embriones bovinos con tres soluciones, la primera con un solo crioprotector permeable (40% de EG), la segunda compuesta por 25% EG + 25% de Dimetilsulfóxido (DMSO) y la última solución de vitrificación contenía 20% de EG + 20% de DMSO + 10% de Butanediol (BD), resaltando que aunque la concentración final permanece similar entre las tres soluciones, el efecto de adicionar distintos crioprotectores permeables a la solución, disminuye la toxicidad reflejándose en el incremento de la viabilidad embrionaria (44,0%; 70,1% y

Tabla 2
Tasa (%) de viabilidad morfológica de embriones murinos post vitrificación de acuerdo a las diferentes soluciones de vitrificación utilizadas

Solución de Vitrificación	Embriones recuperados (n)	Embriones viables (%; [n])	Embriones no viables (%; [n])
SV1	17	0 (0)	100 (17)
SV2	18	72,2 (13)	27,8 (5)
SV3	19	63,2 (12)	36,8 (7)
SV4	16	0 (0)	100 (16)
SV5	19	94,7 (18)	5,3 (1)
SV6	18	77,8 (14)	22,2 (4)
SV7	19	21,1 (4)	78,9 (15)
SV8	18	88,9 (16)	11,1 (2)
Total	144		

71,9%; respectivamente), ya que la permeabilidad de cada crioprotector es incrementada en la presencia del otro (18).

Al probar el efecto de la adición de sucrosa a la solución de vitrificación (Tabla 2), se observó numéricamente un aumento en la tasa de viabilidad embrionaria post vitrificación; esto se demuestra al comparar la SV2 compuesta solamente por etilenglicol (72,2%) con la SV6 conteniendo etilenglicol más sucrosa (77,8%). Este resultado fue similar al encontrado (20), los cuales reportan que al adicionar sucrosa al medio crioprotector, mejoraron la tasa de viabilidad post vitrificación. Similarmente, otro estudio (21), el cual demostró tasas de sobrevivencia superiores en el medio de congelación que contenía sucrosa (disacárido) al 0,1M, al compararlo con un medio conteniendo xilosa (monosacárido) y un medio sin suplementación de azúcar. La adición de un azúcar como la sucrosa, el cual no penetra la membrana celular, en una solución de vitrificación a base de etilenglicol, promueve la deshidratación celular (22).

Sin embargo, en nuestro experimento se presentó una disminución ($p < 0,05$) en la tasa de viabilidad embrionaria post vitrificación, al evaluar el mismo parámetro entre la SV3 (glicerol; 63,2%) vs. la SV7 (glicerol más sucrosa; 21,1%). Mientras que, entre la SV5 (etilenglicol más glicerol; 94,7%) y la SV8 (etilenglicol, glicerol más

sucrosa; 88,9%), aunque se presentó una disminución numérica en el experimento, no existe diferencia significativa ($p > 0,05$), siendo este último resultado similar al obtenido anteriormente (16), quienes no encontraron diferencia al adicionar la sucrosa a la solución de vitrificación, al igual que la investigación realizada con embriones bovinos (22).

Adicionalmente, es interesante resaltar estudios donde obtuvieron aumento de la viabilidad post vitrificación al adicionarle sucrosa a una solución de etilenglicol para la vitrificación de embriones bovinos (23); sin embargo, al igual que en nuestro ensayo al comparar otro crioprotector distinto al etilenglicol, la adición del azúcar no mejoró la sobrevivencia embrionaria.

Se ha reportado que la adición de macromoléculas específicas o azúcares, puede alterar las características de permeabilidad de ciertas soluciones de crioprotectores (19). Debido a esto puede presentarse variabilidad en la viabilidad post vitrificación, dependiendo cuál crioprotector permeable se use en combinación con el azúcar.

Con relación a los embriones no viables, a través de microscopía de luz se identificaron cuatro tipos de alteraciones morfológicas: a) degeneración parcial de la masa celular, es decir, presencia del 50% o menos de las blastómeras con citoplasma granular y membrana plasmática indistinguibles; b) degeneración total de las

blastómeras, correspondiente a blastocitos que presentaban más del 50% de las blastómeras con citoplasma granular y membrana plasmática indistinguibles; c) ausencia de la zona pelúcida, refiriéndose a aquellos embriones que perdieron un fragmento de la cubierta glicoproteica, y d) fractura de zona pelúcida, definiéndose esta anomalía como la presencia de una o más fisuras en la zona pelúcida.

En las ocho soluciones estudiadas se presentó al menos una de las anomalías morfológicas mencionadas (Tabla 3), siendo la SV5 la mezcla crioprotectora que presentó la menor tasa (5,3%) de anomalías morfológicas en el experimento.

Es importante resaltar que la solución de vitrificación 4, la cual contenía solamente sucrosa, no presentó ningún embrión morfológicamente viable, esto debido a que el alto peso molecular, no permite que el azúcar penetre

el interior de las blastómeras y por lo tanto no ejerza un correcto efecto deshidratador, además como consecuencia de la alta viscosidad de la solución, fue difícil la manipulación de los embriones en esta solución.

Experimento 2: Efecto de la mezcla de crioprotectores sobre la formación de cristales de hielo y resistencia a la deformación.

La inspección visual de las soluciones de vitrificación (Figura 1), permitió evidenciar como a medida que la solución favorece la formación de cristales de hielo, ésta presentó una apariencia opaca, mientras que soluciones transparentes carecen de cristales de hielo; en tal sentido, evidenciamos como la SV5 (EG + G) presentó una apariencia completamente transparente, seguida de la SV2 que contenía etilenglicol, la SV3 que contenía glicerol y la SV1 que contenía solución base.

Tabla 3
Tasa (%) de anomalías morfológicas de embriones murinos post vitrificación expuestos a diferentes soluciones de vitrificación

Solución de Vitrificación	Embriones parcialmente degenerados (%; [n])	Embriones completamente degenerados (%; [n])	Embriones con ausencia de zona pelúcida (%; [n])	Embriones con fractura de zona pelúcida (%; [n])
SV1	0 (0)	88,2 (15)	11,8 (2)	0 (0)
SV2	5,6 (1)	11,1 (2)	11,1 (2)	0 (0)
SV3	10,5 (2)	21,0 (4)	0 (0)	5,3 (1)
SV4	43,7 (7)	25 (4)	31,3 (5)	0 (0)
SV5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5,3 (1)
SV6	11,1 (2)	11,1 (2)	0 (0)	0 (0)
SV7	26,3 (5)	42,1 (8)	5,3 (1)	5,3 (1)
SV8	5,5 (1)	0 (0)	0(0)	5,5 (1)

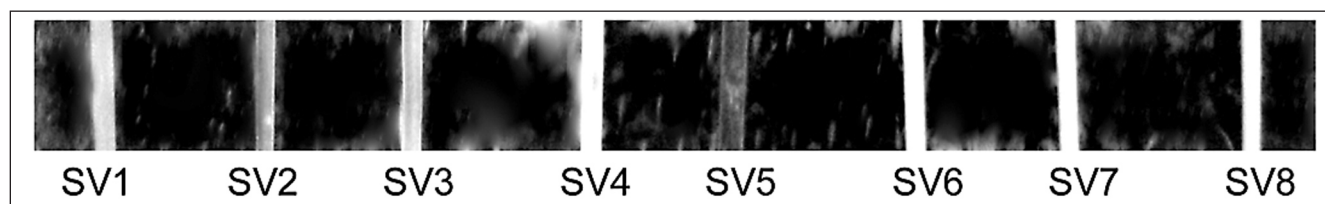


Figura 1. Pajuelas mOPS sumergidas en nitrógeno líquido conteniendo las soluciones de vitrificación.

Es importante resaltar que las SV4, SV6, SV7 y SV8, presentaron una apariencia opaca, coincidiendo con las soluciones que contenían sucrosa, correlacionándose esto con la aseveración expuesta (3), refiere que la presencia de un azúcar en la mezcla crioprotectora altera las propiedades físicas de la solución de vitrificación y con otro estudio en el cual se expone que una solución compuesta por etilenglicol y glicerol, al reemplazar el último crioprotector con sucrosa observaron un marcado incremento de la cristalización, permaneciendo la primera mezcla transparente después de la inmersión en nitrógeno líquido, y la segunda presentó una intensa apariencia opaca (24).

Algunos autores a su vez (25), evaluaron soluciones de etilenglicol con 0,25; 0,5 ó 1M de sacarosa, haciendo referencia que la solución con 0,25M de azúcar permaneció con una apariencia transparente post vitrificación, mientras que las restantes soluciones presentaron una apariencia opaca, no variando significativamente la viabilidad embrionaria. En nuestro experimento, todas las soluciones que contenían sucrosa presentaron un alto grado de cristalización pudiéndose deber a una alta concentración de sucrosa la cual fue de 0,3M para todas.

Posteriormente, al sumergir en nitrógeno líquido una gota de SV5 (Figura 2), por ser la única solución que permaneció sin cristalización durante el enfriamiento, se pudo corroborar la apariencia transparente de la solución, observando que al ejercerle presión presentó una consistencia pastosa (vítrea), al contrario de la SV1 que se usó como solución control que presentaba una apariencia blanquecina y una consistencia bastante dura, lo que estuvo correlacionado con el alto grado de cristalización presente. Es importante destacar, que la apariencia transparente permaneció durante el enfriamiento y el calentamiento. La vitrificación es la solidificación de una solución sin cristalización, en tal sentido, para la criopreservación de células por vitrificación, la solución no debería formar cristales de hielo al sumergirlo en nitrógeno líquido (17).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo, indican que durante la equilibración, es necesario el uso de crioprotectores permeables, ya que en la solución de vitrificación con ausencia de estos compuestos químicos se

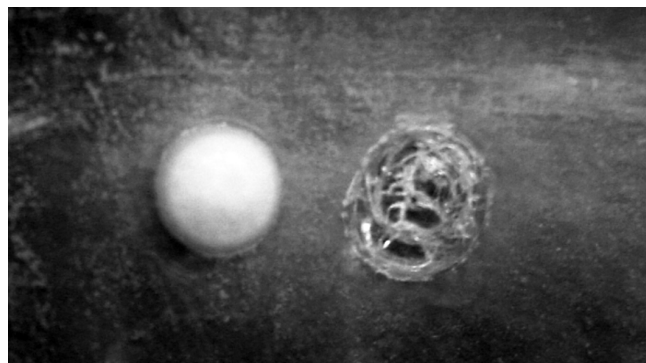


Figura 2. Gotas de SV1 (izquierda) y SV5 (derecha) sumergidas en nitrógeno líquido.

obtuvo un 0% de viabilidad morfológica post vitrificación. El uso del etilenglicol es indispensable en la solución de vitrificación, ya que las soluciones que contenían dicho crioprotector, presentaron los mejores resultados. La solución compuesta por etilenglicol más glicerol (SV5), presentó mayor número de embriones viables además de una apariencia transparente y consistencia pastosa, al sumergirla en nitrógeno líquido, indicando la ausencia de cristales de hielo, siendo ideal en toda solución de vitrificación exitosa. La adición de sucrosa en la mezcla crioprotectora, no aportó mayor beneficio crioprotector. A su vez, se determinaron 4 tipos de anomalías morfológicas, siendo las menos frecuentes: fractura de zona pelúcida y ausencia de zona pelúcida. Por el contrario la degeneración parcial de la masa celular y degeneración total de las blastómeras tuvieron mayor repetibilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Kasai M, Ito K, Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. Human Reproduction. 2002; 17: 1863-1874.
- (2) Kasai M. Cryopreservation of mammalian embryos. Molecular Biotechnology. 1997; 7: 173-179.
- (3) Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. Cryobiology. 2001; 43: 21-31.
- (4) Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. Biology of Reproduction. 2002; 67: 1671-1680.

- (5) Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. Human Reproduction Update. 2003; 9: 583-605.
- (6) Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. Theriogenology. 2006; 65: 236-244.
- (7) Visintin JA, Martins JF, Bevilacqua EM, Mello MR, Picasio AC, Assumpção ME. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: are they really different? Theriogenology. 2002; 57:345-359.
- (8) Ali J, Shelton JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. Journal of Reproduction and Fertility. 1993; 99: 471-477.
- (9) Palasz AT, Mapletoft J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. Biotechnology Advances. 1996; 14: 127-149.
- (10) Cabrera P, Fernández A, Bastidas P, Perozo E, Molina M, Bethencourt A, Vivas I, Reyes Y, Díaz T. Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad morfológica de embriones murinos (*Mus musculus*). Zootecnia Tropical. 2008; 26:1-8.
- (11) Silva ME, Berland MA. Vitrificación de blastocitos bovinos producidos *in vitro* con el método Open Pulled Straw (OPS): Primer reporte. Archivos de Medicina Veterinaria. 2004; 36: 79-85.
- (12) Hochi S, Akiyama M, Minagawa G, Kimura K, Hanada A. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of *in vitro* – matured bovine oocytes. Cryobiology. 2001; 41: 69-73.
- (13) Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. Fertility and Sterility. 2001; 76: 618-620.
- (14) Otsuka J, Takahashi A, Nagaoka M, Funabashi H. Optimal equilibration conditions for practical vitrification of two-cell mouse embryos. Comparative Medicine. 2002; 52: 342-346.
- (15) Tominaga K. Cryopreservation and sexing of *in vivo* – and *in vitro* – produced bovine embryos for their practical use. Journal of Reproduction and Development. 2004; 50: 29-38.
- (16) López-Béjar M, López-Gatius F. *In vitro* and *in vivo* survival of vitrified rabbit embryos. Theriogenology. 2000; 53: 259.
- (17) Jin B, Kusanagi K, Ueda M, Seki S, Valdez D, Edashige K, Kasai M. Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. Cryobiology. 2008; 56: 233-240.
- (18) Manjunatha B, Gupta P, Ravindra J, Devaraj M, Nandi S. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced *in vitro*. The Veterinary Journal. 2009; 179: 287-291.
- (19) Pugh P, Tervit H, Niemann H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos, following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. Animal Reproduction Science. 2000; 58: 9-22.
- (20) Guignot F, Bouttier A, Baril G, Salvetti P, Pignon P, Beckers J, Touze J, Cognie J, Traldi A, Cognie Y, Mermillod P. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. Theriogenology. 2006; 66: 1004-1011.
- (21) Lim K, Jang G, Ko K, Lee W, Park H, Kim J, Kang S, Lee B. Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. Animal Reproduction Science. 2008; 103: 239-248.
- (22) Varago FC, Saliba WP, Alvim MT, Vasconcelos AB, Oliveira CH, Stahlberg R, Lagares MA. Vitrification of *in vitro* produced Zebu embryos. Animal Reproduction. 2006; 3: 353-358.
- (23) Martínez A, Brogliatti G, Lagomarsino H. Comparison of one-step methods for freezing bovine embryos. Theriogenology. 1999; 51: 169 (Abstract).
- (24) López-Béjar M, López-Gatius F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. Theriogenology. 2002; 58: 1541-1552.
- (25) Oliveira A, Forell F, Medeiros C, Lopes R, Rodrigues E. Verificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, usando etilenoglicol e sacarosa. Ars Veterinaria. 2003; 19: 191-201.