

## Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad morfológica de embriones murinos (*Mus musculus*)

Pedro Cabrera<sup>1\*</sup>, Adriana Fernández<sup>1</sup>, Pedro Bastidas<sup>1</sup>, Edison Perozo<sup>1</sup>, Magaly Molina<sup>2</sup>,  
Angélica Bethencourt<sup>3</sup>, Isis Vivas<sup>4</sup>, Yuraima Reyes<sup>5</sup> y Thaís Díaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela (FCV-UCV), Apartado 4563, Maracay 2101A, Aragua, Venezuela. \*Correo electrónico: pedro.cabrera@ucv.ve

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Sanidad Animal, Maracay, Aragua, Venezuela.

<sup>3</sup> Laboratorio de Hemoparásitos, Cátedra de Parasitología, FCV-UCV. Maracay, Aragua. Venezuela.

<sup>4</sup> Cátedra de Estadística, FCV-UCV. Maracay, Aragua. Venezuela.

<sup>5</sup> Bioterio, FCV-UCV. Maracay, Aragua. Venezuela.

---

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la viabilidad morfológica post vitrificación de embriones murinos (*Mus musculus*), de dos estadios de desarrollo (mórula y blastocito), obtenidos *in vivo* de hembras superovuladas, para lo cual se utilizaron los siguientes criterios: blastómeras morfológicamente intactas, zona pelúcida íntegra y re-expansión del blastocele. Quinientos setenta y dos embriones murinos de excelente calidad se vitrificaron a través de la técnica pajuela estirada abierta modificada, utilizando una solución de equilibración (25% de etilenglicol, 25% de glicerol) en tres pasos. No hubo diferencia significativa ( $P>0,05$ ), entre la tasa de recuperación para mórulas (92,6%) y blastocitos (93,7%). Sin embargo, se obtuvo diferencia ( $P<0,05$ ) para la viabilidad morfológica post vitrificación, siendo mayor el número de blastocitos con apariencia morfológica normal (93,3%) comparado con el número de mórulas (87,5%). Se observaron seis tipos de anomalías morfológicas: pérdida de la esfericidad, ausencia parcial de zona pelúcida, fractura de zona pelúcida, presencia de blastómeras extruidas, degeneración parcial de la masa celular y degeneración total de las blastómeras. A su vez, se evidenció diferencia en la aparición de daño embrionario post vitrificación, solamente 6,7% de los blastocitos *versus* 12,5% de las mórulas presentaron daño. Estos resultados representan la primera aplicación en Venezuela de la técnica de vitrificación en embriones mamíferos, sugiriendo que los blastocitos toleran con mayor eficiencia la vitrificación que las mórulas, ya que presentaron una tasa superior de viabilidad morfológica y una menor frecuencia de anomalías morfológicas que las mórulas.

*Palabras clave:* embrión, murinos, vitrificación.

---

### Vitrification effect on the morphological viability of murine embryos (*Mus musculus*)

#### ABSTRACT

The objective of present study was to evaluate the morphological viability post vitrification of murine embryos (*Mus musculus*) of two stages (morulae and blastocyst), obtained *in vivo* from superovulated female, following this criterion: morphologically intact blastomeres, intact zona pellucida, and re-expanding of the blastocele. Five hundred seventy two murine embryos of excellent quality were vitrified through the modified open pulled straw procedure, using an equilibrated solution (25% of ethylene glycol, 25% of glycerol) in three steps. There were not significant differences ( $P>0.05$ ), between recovery rates for morula (92.6%) and blastocyst stage (93.7%). Nevertheless, we observed differences ( $P<0.05$ ) for post vitrification morphological viability, being higher the number of blastocysts with normal morphological appearance (93.3%) compared to the number of morulae (87.5%). Six types of morphological abnormalities were observed: loss of spherical shape, partial absence and

Recibido: 19/07/2007 Aceptado: 15/11/2007

fracture of the zona pellucida, presence of extruded blastomeres, partial degeneration of the cellular mass, and total degeneration of blastomeres. Also differences in post vitrification damage were observed; only 6.7% of the blastocysts *versus* 12.5% of morulae had damage. These results represent the first experience of the vitrification technique in mammal embryos in Venezuela, suggesting that blastocysts tolerate the vitrification process more than morulae, because a higher viability and lower frequency of morphological abnormalities than morulae.

*Keywords:* embryo, murine, vitrification.

## INTRODUCCIÓN

La producción de embriones, tanto *in vivo* como *in vitro*, es una técnica biotecnológica de suma importancia que nos permite maximizar la descendencia de una hembra donadora élite. Uno de los posibles destinos para estos embriones es la criopreservación, el cual es un procedimiento que nos permite mantener a temperaturas bajo cero por tiempo indefinido este material biológico, para ser utilizado en el momento más oportuno. El método de criopreservación por vitrificación forma parte de los procedimientos no equilibrados, ya que las células no están en equilibrio con las altas concentraciones de crioprotectores permeables y no permeables antes de un enfriamiento rápido, constituyendo el desarrollo y la aplicación de la vitrificación, una alternativa factible para la criopreservación de embriones (Dobrynsky, 2002).

La vitrificación es un método de criopreservación extremadamente rápido, en el cual los embriones son incluidos en una solución altamente concentrada de crioprotectores, solidificándose durante el enfriamiento sin la formación de cristales de hielo. El fenómeno requiere de tasas rápidas de enfriamiento, lográndose en condiciones prácticas, mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido, representando una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 2.500°C/min, y demorándose así, pocos segundos en criopreservarse. La solución no se cristaliza, se vitrifica, es decir, aumenta abruptamente su viscosidad y se transforma a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, de donde el método toma su denominación, conservando la distribución normal tanto molecular como iónica del estado líquido (Shaw y Jones, 2003; Silva y Berland, 2004).

La mayoría de las investigaciones y aplicaciones de la criopreservación de embriones es realizada principalmente en tres especies: murina, bovina y humana (Rall, 1992). Una voluminosa cantidad

de investigaciones básicas y aplicadas sobre los mecanismos criobiológicos han sido realizadas sobre embriones de ratón (Prather y First, 1988; Rall, 1992), siendo dichas investigaciones ejecutadas como técnicas de rutina en bioterios o extrapolables a distintas especies de animales domésticos, en las cuales los roedores son utilizados como modelo animal experimental. Existen dos factores que favorecen el desarrollo de investigaciones de criobiología en los roedores de laboratorio, como son los costos y el abastecimiento de los embriones. Los costos tanto de mantenimiento, como de los tratamientos hormonales son considerablemente inferiores en animales de laboratorio que en especies domésticas; a su vez, el abastecimiento de embriones, es decir, el número de embriones colectados por hembra es significativamente superior (Prather y First, 1988).

Todos los estadios preimplantacionales de embriones murinos pueden ser exitosamente criopreservados (Leibo *et al.*, 1996). Sin embargo, el estadio de desarrollo de los embriones antes de la criopreservación influye significativamente sobre su viabilidad (López-Béjar y López-Gatius, 2002). El conocimiento del estadio de desarrollo más resistente a la vitrificación permitiría seleccionarlo como el ideal para ser sometido a la criopreservación. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar la viabilidad morfológica del embrión post vitrificación, de dos estadios de desarrollo (mórula y blastocito) de embriones murinos, determinando de esta manera la resistencia al proceso de criopreservación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se escogieron ratones hembra vírgenes (*Mus musculus*) de la cepa NIH, con un rango de edad entre 6 a 8 semanas, y ratones macho de la misma cepa, con una edad promedio de 8 semanas, a los cuales previamente se les comprobó su fertilidad. Las hembras fueron sometidas a un protocolo de superovulación y colecta de embriones, denominando día cero al inicio del

tratamiento hormonal, indistintamente de la fase del ciclo estral de la donadora, ya que no existe diferencia significativa en cuanto al número de embriones colectados en las diferentes fases del ciclo estral (Muñoz *et al.*, 1992). El protocolo superovulatorio se inició con la administración de una dosis de 10 UI de gonadotropina coriónica equina (eCG; Folligon®, Intervet), por vía intraperitoneal entre las 14:00 y 16:00 h. Cuarenta y ocho horas después se aplicó una dosis de 10 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; Pregnyl®, Organon), por vía intraperitoneal, colocando las hembras inmediatamente en contacto con machos enteros en relación 1:1. Dieciocho horas después se visualizó la presencia del tapón vaginal como indicador positivo de monta, siendo sólo estas hembras las que fueron posteriormente colectadas el día seis entre las 08:00 y 10:00 h. Para efectos de este trabajo experimental, se escogieron de dichas colectas solo los embriones de calidad excelente y congelable. La primera clasificación fue hecha siguiendo los parámetros descritos por Lidner y Wright (1983), quienes clasifican los embriones excelentes como embriones simétricos, esféricos, con células de tamaño, color y textura uniforme. La segunda clasificación se basó en los parámetros de Butler y Biggers (1989) quienes señalaron que los embriones congelables son aquellos en los que el estadio de desarrollo se corresponde con el estadio esperado al momento de la colecta, tomando en cuenta las horas transcurridas después de la fertilización.

Un total de 572 embriones murinos colectados, de excelente calidad y congelable, fueron sometidos al proceso de vitrificación, de los cuales la mitad presentaba el estadio de mórula ( $n = 286$ ) y la mitad restante el estadio de blastocito ( $n = 286$ ).

Durante la fase de equilibración (exposición a los crioprotectores) los embriones fueron sometidos a tres concentraciones de mezcla crioprotectora, incrementando gradualmente la concentración de los crioprotectores de la siguiente manera: paso 1: 10% glicerol (v/v, Sigma) durante 5 min, paso 2: 10% glicerol más 20% etilenglicol (v/v, Sigma) durante 5 min y paso 3: 25% glicerol más 25% etilenglicol (v/v, Sigma) durante 30 seg. Los embriones, de acuerdo a su estadio de desarrollo, se aspiraron en pajuelas mOPS (pajuela plástica de 0,25  $\mu$ L sometida a calor para ser reducido su diámetro interno aproximadamente a la mitad, al ser estirada), almacenando en 176 pajuelas 1, 2, 4 ó 6 embriones por pajuela y cerciorándose

que la columna de solución contentiva del embrión se ubicara en la porción mas delgada de la pajuela, separada por burbujas de aire, de dos columnas de solución de vitrificación, procediendo finalmente a sellar el extremo abierto con alcohol polivinílico.

Las pajuelas, en la fase de enfriamiento, se expusieron durante 3 min a vapores de nitrógeno líquido, antes de ser sumergidas en el material congelante, durante un tiempo promedio de 4 h. Durante la fase de calentamiento, la pajuela es sacada del nitrógeno líquido y mantenida durante aproximadamente 4 seg a temperatura ambiente e inmediatamente sumergida en agua, que posee una temperatura aproximada de 25°C, durante 8 seg. Tan pronto como la solución de vitrificación que contiene al embrión comienza a tomar una apariencia clara, la pajuela es removida del agua y secada rápidamente.

Durante la fase de dilución (remoción de los crioprotectores), el contenido de la pajuela se expuso a tres soluciones con concentraciones decrecientes de sucrosa (1, 0,5 y 0,25 M), manteniendo los embriones sumergidos por un lapso de 5 min 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 (Silva y Berland, 2004).

Finalmente, luego del proceso de dilución los embriones fueron evaluados con un microscopio invertido a una magnificación de 200X (Carl Zeiss), con el objeto de determinar la tasa de sobrevivencia morfológica (Edashige *et al.*, 1999; Hochi *et al.*, 2001), o también denominada tasa de embriones morfológicamente viables (Cocero *et al.*, 1996). Dicha tasa corresponde al número de embriones con todas las blastómeras morfológicamente intactas y la zona pelúcida íntegra, post vitrificación, y en el caso de los blastocitos con re-expansión del blastocelo (Mukaida *et al.*, 1998; 2001), todo esto con base en el número de embriones recuperados post vitrificación (Otsuka *et al.*, 2002). Asimismo, se procedió a cuantificar la presencia de anomalías morfológicas y los tipos de dichas anomalías.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados aplicando estadística descriptiva, la prueba no paramétrica de

Kruskal Wallis y la prueba de proporciones con la ayuda del paquete estadístico SAS (1998).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de recuperación total de embriones post vitrificación fue de 93,2% (533/572), perdiéndose solo el 6,8% (39/572) de los embriones durante el proceso de enfriamiento, calentamiento y dilución. Esta tasa de recuperación resultó superior a la reportada por Lazar *et al.* (2000) y Silva y Berland (2004), quienes obtuvieron para embriones bovinos producidos *in vitro* y vitrificados por la técnica OPS un 92,8% (108/117) y 83% (83/93), respectivamente, siendo igualmente superior (80%) a la reportada por Ratto *et al.* (1998) para embriones bovinos *in vitro* y vitrificados por la técnica tradicional, en pajuelas de 250  $\mu$ L sin estirar, y por Zhu *et al.* (1996) en embriones murinos vitrificados igualmente por la técnica tradicional (87%; 786/905).

Sin embargo, la tasa de recuperación obtenida fue similar a la reportada por Miyoshi *et al.* (1992) y Mukaida *et al.* (1998), la cual fue de 93 y 95,3% respectivamente, para embriones murinos vitrificados usando la técnica tradicional. En el caso de embriones bovinos obtenidos *in vitro*, vitrificados de manera tradicional, se reporta 95% de tasa de recuperación (Yang *et al.*, 1992), y para embriones humanos, vitrificados por una técnica similar, 97% (Van der Zwalmen *et al.*, 2002). De igual forma, Moussa *et al.* (2005), reportaron, en la especie equina, un mayor porcentaje de pérdida de embriones (9%), sometidos a la técnica OPS, al encontrado en este trabajo de investigación.

De acuerdo al estadio de desarrollo no existe diferencia significativa en relación a la tasa de recuperación ( $P>0,05$ ), siendo ésta de 92,6% (265/286) para las mórulas y 93,7% (268/286) para los blastocitos, resultados similares a los reportados por Van der Zwalmen *et al.* (2002) quienes recuperaron 54 mórulas de las 55 vitrificadas (98,1%) y recuperaron 108 blastocitos de los 112 vitrificados (96,4%).

Adicionalmente, no se evidenció diferencia significativa entre el total de 176 pajuelas vitrificadas ( $P>0,05$ ), indicando esto, que la tasa de recuperación fue constante y repetible durante todo el ensayo.

Del total de 533 embriones recuperados, 482 presentaron características morfológicamente

normales post vitrificación, representando un 90,4% (482/533), lográndose mantener un alto nivel de embriones morfológicamente normales, sin diferencia significativa ( $P>0,05$ ) entre las 176 pajuelas procesadas. La tasa de sobrevivencia morfológica obtenida resultó superior a la reportada por López-Béjar y López-Gatius (2000) en conejos, la cual fue de 79,5% (279/351) luego de ser vitrificados en forma tradicional, y a la reportada posteriormente para la misma especie (89,5%; 376/420) inmediatamente después de ser aplicada la técnica OPS modificada (López-Béjar y López-Gatius, 2002). De igual manera, nuestro resultado es superior al reseñado por Mukaida *et al.* (2001) quienes reportan 63% (38/60) de sobrevivencia morfológica en embriones humanos sometidos a la técnica "cryoloop", y por último al 86% (43/50), obtenido en embriones murinos vitrificados de manera tradicional por Otsuka *et al.* (2002). Sin embargo, existen investigaciones que reportan tasas similares de sobrevivencia morfológica (97%) en embriones murinos de dos células sometidos a vitrificación tradicional (Edashige *et al.*, 1999).

Con relación al estadio de desarrollo y la apariencia morfológica del embrión post vitrificación, obtuvimos que un mayor número de embriones (250/268; 93,3%;  $P<0,05$ ), en estadio de blastocito, conservó la apariencia morfológica normal, cuando se comparó con los embriones en estadio de mórula (232/265; 87,5%; Cuadro 1).

Cocero *et al.* (1996) reportaron diferencia en la sobrevivencia morfológica dependiendo del estadio de desarrollo en embriones ovinos sometidos a congelación lenta, siendo este parámetro superior en blastocitos (86,0%; 80/93) y significativamente inferior en mórulas (65,6%; 88/134). Esta diferencia se corresponde con la obtenida en esta investigación.

Con relación a las anomalías morfológicas se evidenció en un 9,6% (51/533) del total de embriones recuperados, siendo la tasa de embriones morfológicamente normales y anormales, diferente significativamente ( $P<0,05$ ).

En este reducido número de embriones morfológicamente anormales (51/533) fueron identificados, a través de microscopía de luz, seis tipos de alteraciones morfológicas. En este sentido, de los 533 embriones recuperados dos de ellos presentaron pérdida de la esfericidad (0,3%), es decir, luego del proceso de criopreservación, el embrión presentó una

Cuadro 1. Número (n) y porcentaje de embriones murinos post vitrificación morfológicamente viable y no viable de acuerdo a su estadio de desarrollo

Estadio de desarrollo	Viables		No viables	
	n	%	n	%
Mórulas	232	87,5b†	33	12,5a
Blastocitos	250	93,3a	18	6,7b

† Valores con diferentes letras en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

aparición aplanada en un eje y una forma ligeramente cuadrada en el eje perpendicular. Igual número de embriones (2; 0,3%) exhibió ausencia parcial de la zona pelúcida, refiriéndose a aquellos embriones que perdieron un fragmento de la cubierta glicoproteica. Sin embargo, fue superior el número de embriones (4; 0,7%) que solamente presentó fractura de zona pelúcida, definiéndose esta anomalía como la presencia de una o más fisuras en la zona pelúcida. Al agrupar los dos distintos daños de la zona pelúcida se obtuvo el 1% (6/533) de los embriones anormales. Otra anomalía morfológica, como es la presencia de células extruidas, referida a la ubicación de más de dos blastómeras fuera de la masa celular, fue encontrada en ocho embriones (1,5%). Un 3% de los embriones recuperados (16/533) mostró degeneración parcial de la masa celular, es decir, presencia del 50% o menos de las blastómeras con citoplasma granular y membrana plasmática indistinguibles. Por último, la presencia de embriones con degeneración total, en los cuales más del 50% de las blastómeras se encontraban degeneradas, fue la anomalía más frecuente (3,5%; 19/533).

El número de fracturas de la zona pelúcida encontrado en nuestra investigación fue considerablemente inferior al reportado en otras especies mamíferas por Silva y Berland (2004) para embriones bovinos obtenidos *in vitro* y vitrificados por la técnica OPS (4,8%) y por Moussa *et al.* (2005) para embriones equinos sometidos a la misma técnica (10%). Sin embargo, nuestros resultados con relación a la pérdida de zona pelúcida son ligeramente superiores a los reportados para la especie bovina (0%) por Vajta *et al.* (1998) y por Lazar *et al.* (2000), e inferiores a los obtenidos por Vajta *et al.* (1997) para la misma especie (1%), y por Mukaida *et al.* (1998) para

embriones murinos de 8 células (1,6%), vitrificados de forma tradicional.

De acuerdo a la aparición de daño embrionario, dependiendo del estadio de desarrollo entre mórula y blastocito, este último estadio presentó la menor tasa de anomalías (6,7%; 18/268), resultando inferior significativamente ( $P < 0,05$ ) a la tasa encontrada para embriones en estadio de mórula (12,5%; 33/265; Cuadro 1). La presencia de alguno de los seis tipos de anomalías no difirió ( $P > 0,05$ ) dependiendo del estadio de desarrollo (Cuadro 2), pero sí fue encontrada una diferencia numérica favoreciendo a los embriones en estadio de desarrollo de blastocito con niveles inferiores o iguales en las seis anomalías encontradas, resultado que difiere del reportado por Van der Zwalm *et al.* (2002), quienes obtuvieron un 25,9% (14/54) de degeneración parcial, después del calentamiento, en embriones humanos en estadio de mórula, vitrificados por la técnica tradicional y un porcentaje mayor (52,7%; 57/108) para el estadio de desarrollo de blastocito.

Del total de 176 pajuelas vitrificadas, en 131 de ellas, todos los embriones almacenados presentaron morfología normal, representando un 74,4%, siendo esto significativamente superior ( $P < 0,05$ ) al total de pajuelas con presencia de al menos un embrión morfológicamente anormal (25,6%).

Igualmente, del total de 176 pajuelas procesadas, la mitad ( $n = 88$ ) fue cargada con embriones en estadio de desarrollo de mórula y la otra mitad fue cargada con embriones en estadio de blastocito, observándose que la tasa de embriones morfológicamente normales y anormales, por pajuela, entre los estadios de desarrollo evaluados, no difirió ( $P > 0,05$ ).

Cuadro 2. Número (n) y porcentaje de mórulas y blastocitos murinos de acuerdo a los tipos de anomalías post vitrificación.

Tipo de anomalía	Mórulas		Blastocitos		P
	n	%	n	%	
Pérdida de la esfericidad	2	0,7	0	0	ns†
Fractura de zona pelúcida	2	0,7	2	0,7	ns
Ausencia parcial de zona pelúcida	1	0,3	1	0,3	ns
Células extruidas	4	1,5	4	1,4	ns
Parcialmente degenerados	9	3,4	7	2,6	ns
Degenerados totalmente	15	5,6	4	1,4	ns

† ns: No significativo

La descripción morfológica, bajo microscopía de luz, inmediatamente después de la dilución de los embriones, nos permite evaluar el proceso de vitrificación y a su vez, sirve como un estimador práctico de la viabilidad de los embriones, idea respaldada por reportes que correlacionan de manera significativa la presencia de embriones humanos, parcialmente degenerados, con tasas de re-expansión in vitro inferiores (43,7%; 369/844), comparadas con embriones morfológicamente intactos (79%; 1164/1474; Van der Abbeel y Van Steirteghem, 2000). De igual manera, Rüllicke y Autenried (1995) reportan que la presencia de una anomalía morfológica (degeneración parcial de la masa celular), detectada inmediatamente después de la criopreservación en embriones murinos, permite predecir una baja tasa de re-expansión in vitro (61,5%; 32/52), al compararla con embriones en similares condiciones pero con características morfológicas normales post criopreservación (86,4%; 319/369). Igual comportamiento fue presentado cuando transfirieron embriones murinos a hembras receptoras, logrando en un 26,1% (23/88) la culminación de la gestación con embriones parcialmente degenerados, resultado inferior al logrado con embriones intactos (53,4%; 47/88).

### CONCLUSIONES

Los resultados presentados, constituyen las primeras experiencias de vitrificación en embriones murinos a nivel nacional. Se evidenció que el mayor número y mejor desarrollo celular de los blastocitos coincidió con un nivel más elevado de integridad

morfológica, cuando fueron criopreservados; por lo que el estadio de desarrollo influye significativamente sobre la viabilidad embrionaria post vitrificación. La técnica de criopreservación por vitrificación constituye una alternativa para la preservación de embriones, siendo repetible, de fácil ejecución, costo-eficiente y con requerimientos mínimos de insumos.

### LITERATURA CITADA

- Butler J.E. y J.D. Biggers. 1989. Assessing the viability of preimplantation embryo in vitro. *Theriogenology*, 31: 115-126.
- Cocero M.J., A. Lopez, M.L. Barragan y R.A. Picazo. 1996. Differences on post – thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology*, 33: 502-507.
- Dobrinsky J.R. 2002. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57: 285-302.
- Edashige K., A. Asano, T. Zhu y M. Kasai. 1999. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryo by short – term culture. *Cryobiology*, 38: 273-280.
- Hochi,S., M. Akiyama, G. Minagawa, K. Kimura y A. Hanada. 2001. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro – matured bovine oocytes. *Cryobiology*, 41: 69-73.

- Lazar L., J. Spak y V. David. 2000. The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*, 54: 571-578.
- Leibo S.P., A. Martino, S. Kobayashi y J.W. Pollard. 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Anim. Rep. Sci.*, 42: 45-53.
- Lidner G. y R. Wright Jr. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-416.
- López-Béjar M. y F. López-Gatius. 2000. *In vitro* and *in vivo* survival of vitrified rabbit embryos. *Theriogenology*, 53: 259 (Abstr.).
- López-Béjar M. y F. López-Gatius. 2002. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. *Theriogenology*, 58: 1541-1552.
- Miyoshi I., K. Ishikawa, M. Kasai y N. Kasai. 1992. A practical transport system for mouse embryos cryopreserved by simple vitrification. *Lab. Anim. Sci.*, 42: 323-325.
- Moussa M., I. Bersinger, P. Doligez, F. Guignot, G. Duchamp, M. Vidament, P. Mermillod y J. Bruyas. 2005. *In vitro* comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, 64: 1619-1632.
- Mukaida T., S. Nakamura, T. Tomiyama, S. Wada, M. Kasai y K. Takahashi. 2001. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fert. Ster.*, 76: 618-620.
- Mukaida T., S. Wada, K. Takahashi, P.B. Pedro, T.Z. An y M. Kasai. 1998. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Human Repr.*, 13: 2874-2879.
- Muñoz I., A. Gutiérrez, C. Rodríguez y B. Pintado. 1992. Influencia del ciclo estral sobre la respuesta a tratamientos de superovulación en ratonas. *Rev. Exp. Anim.*, 3: 121-125.
- Otsuka J., A. Takahashi, M. Nagaoka y H. Funabashi. 2002. Optimal equilibration conditions for practical vitrification of two-cell mouse embryos. *Comp. Med.*, 52: 342-346.
- Prather R.S. y N.L. First. 1988. A review of early mouse embryogenesis and its applications to domestic species. *J. Anim. Sci.*, 66: 2626-2635.
- Rall W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Repr. Sci.*, 28: 237-245.
- Ratto M., M. Berland, M. Wolter, M. Silva y R. Matamoros. 1998. Vitrificación de embriones bovinos: Antecedente preliminar. *Arch. Med. Vet.*, 30: 187-188.
- Rülicke T. y P. Autenried. 1995. Potential of two-cell mouse embryos to develop to term despite partial damage after cryopreservation. *Lab. Anim.*, 29: 320-326.
- SAS. 1998. SAS/STAT User's guide. Release 6.03. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Shaw J.M. y G.M. Jones. 2003. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Repr. Update*, 9: 583-605.
- Silva M.E. y M.A. Berland. 2004. Vitrificación de blastocitos bovinos producidos *in vitro* con el método open pulled straw (OPS): Primer reporte. *Arch. Med. Vet.*, 36: 79-85.
- Vajta G., P.J. Booth, P. Holm, T. Greve y H. Callesen. 1997. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-letters*, 18: 191-195.
- Vajta G., I.M. Lewis, M. Kuwayama, T. Greve y H. Callesen. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Repr.Dev.*, 51: 53-58.
- Van der Abbeel E. y A. Van Steirteghem. 2000. Zona pellucida damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and *in vitro* viability. *Human Repr.*, 15: 373-378.

- Van der Zwalm P., G. Bertin, Ch. Debauche, V. Standaert, E. Van Roosendaal, M. Vandervorst, N. Bollen, H. Zech, T. Mukaida, K. Takahashi y R. Schoysman. 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Human Repr.*, 17: 744-751.
- Yang N.S., K.H. Lu, I. Gordon y C. Polge. 1992. Vitrification of bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 37: 326 (Abstr.).
- Zhu S.E., T. Sakurai, K. Edashige, T. Machida y M. Kasai. 1996. Cryopreservation of zona-hatched mouse blastocysts. *J. Repr. Fert.*, 107: 37-42.