

Evaluación de dos métodos de criopreservación sobre la calidad de embriones producidos *in vitro*.

César A Serrano Novoa¹, MV; Rosa Sierra¹, Bact; Juan E Sanchez¹, MVZ; Luis F Restrepo¹, Est. Esp.; Martha Olivera Angel¹, MV.,Dr.Sci.Agr.

¹Grupo Biogénesis, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia*. mvzucc@yahoo.com

(Recibido: 28 septiembre, 2001; aceptado: 6 septiembre, 2002)

Resumen

Con el objetivo de comparar dos métodos de criopreservación, Congelación Lenta (CL) y Vitrificación (V) sobre la calidad (morfología y nuclearidad) de embriones bovinos producidos in-vitro; blastocitos de excelente calidad (90-100 células), fueron criopreservados por CL (77) y V (50) y evaluados por microscopía óptica al descongelamiento y posterior a 12 horas de cultivo. La morfología y la nuclearidad fueron registradas: Compacto, Parcialmente Expandido, Expandido, Picnótico y Fragmentado; <40, 40-60, 61-80 y >80 núcleos. Al descongelamiento los embriones Parcialmente Expandidos se caracterizaron por tener <40 núcleos. Los embriones Compactos y Expandidos presentaron la mayor cantidad de núcleos (61-80;>80). El 57.3% de los embriones presentaron <40 núcleos. El 17.7% de los embriones presentaron más de 60 núcleos. A las 12 horas el 36.6% de los embriones presentó más de 60 núcleos, recuperándose en un 132.7% con el cultivo. No existió diferencia entre las técnicas de criopreservación ($p>0.05$) en ninguna de las fases. Al evaluar conjuntamente ambas fases, todos los embriones con más de 60 núcleos al descongelamiento, aumentaron su nuclearidad durante el cultivo y algunos (20%) de los que presentaron baja nuclearidad pasaron a tener más de 60 núcleos, y aunque expandieron, presentaron picnosis. Los embriones con <40 núcleos, presentaron compactación y picnosis. Los embriones con 40-60 núcleos aunque expandieron, presentaron picnosis y fragmentación. Más que al método de criopreservación, las alteraciones celulares observadas podrían deberse a características propias de los embriones producidos in-vitro. Se necesitan nuevas investigaciones que caractericen posibles factores de competencia embrionaria para soportar procesos de criopreservación, ya que algunos embriones resisten sin problema dicha práctica.

Palabras clave: congelación, FIV, vitrificación.

Introducción

La criopreservación de embriones es un complemento de la Fertilización *In Vitro* (FIV) como una manera de mantener bancos de germoplasma con fines investigativos, de preservación o prácticos. Diversas técnicas han sido utilizadas, transponiendo las de los embriones producidos *in vivo*, dentro de ellas, principalmente los métodos de congelación

(rápida y lenta), han sido los de mayor uso por los diferentes grupos de trabajo o investigación en nuestro medio.

Durante el procesamiento y enfriamiento de los embriones, o durante la recuperación de los mismos luego de la descongelación, existen riesgos de daños por varios factores que incluyen: 1) toxicidad de crioprotectores; 2) lesión por el “superenfriamiento”;

3) daños físicos a la membrana por cristales extracelulares formados durante el enfriamiento; 4) toxicidad por la concentración de electrolitos; 5) formación y crecimiento de cristales intracelulares lesivos para la membrana u organelas citoplasmáticas; 6) fracturas celulares; 7) lisis por las diferencias en la osmolaridad dentro y fuera de la célula (13).

Dentro de los procesos de criopreservación existen diferentes factores que afectan la eficiencia del proceso y la supervivencia así como la viabilidad de los embriones, después de la congelación y descongelación, que se deben tener presentes antes de realizar el proceso; entre los factores más relevantes tenemos la calidad y el estado de desarrollo de los embriones (8), siendo más susceptibles a procesos de enfriamiento y calentamiento aquellos embriones en estado temprano de desarrollo (18). Se ha descrito que los embriones producidos *in vitro* son más susceptibles a éstos procesos de enfriamiento y calentamiento que los producidos *in vivo*, al parecer, como un resultado de sus variaciones y diferencias morfológicas y bioquímicas, entre ellas, la estructura de la zona pelúcida, la cual es más fácilmente digerida por métodos enzimáticos pero más resistente a la eclosión en los embriones *in vitro* (15), el grado de compactación de la mórula (10,20), el pobre contacto intercelular (21), el incremento del contenido lipídico intracelular (16, 17) y el tamaño y número de células de la masa celular interna (22), diferencias que se han atribuido al medio ambiente inapropiado de la maduración de los oocitos y al sistema de cultivo embrionario utilizado (16, 22).

El objetivo de este estudio fue evaluar la calidad de embriones bovinos producidos *in vitro*, mediante el análisis de su morfología y nuclearidad postdescongelación, sometidos al método estándar (congelación lenta) y al de Vitricación.

Materiales y métodos

Embriones. El procedimiento de obtención, maduración, fertilización de oocitos y de desarrollo de embriones bovinos, se realizó de acuerdo a lo descrito por Camargo y colaboradores (3). Brevemente: Oocitos recuperados de ovarios provenientes de matadero principalmente de razas cebú y Holstein, fueron madurados por 24 horas en gotas de 100 μ l de medio de maduración (TCM 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino, piruvato, LH, FSH, Estradiol y penicilina/

anfotericina) e inseminados con semen separado por gradiente de Percoll de toro Blanco oreji-negro (BON), ajustando la concentración a 1×10^6 células por ml, en medio de fertilización (IVF-TALP suplementado con Heparina, Hipotaurina, Penicilamina y Epinefrina) en el cual permanecieron por 18 horas, para ser finalmente cultivados en medio de desarrollo (CR1-AA) durante 7 días hasta alcanzar su estado de blastocito. Durante todo el tiempo de incubación los oocitos/embriones fueron mantenidos en condiciones de una tensión de CO₂ del 5%, humedad relativa del 95% y una temperatura de 39 °C.

Unidades Experimentales. 77 embriones en estadio de blastocito y de excelente calidad de acuerdo a su nuclearidad (90 – 100 células) y a su morfología (integridad de masa celular interna y zona pelúcida, citoplasma homogéneo, blastómeras de talla homogénea y sin signos de picnosis), fueron criopreservados siguiendo el protocolo de congelación lenta (Tto C) y 50 por el de vitricación (Tto V) de acuerdo al protocolo que se describe a continuación.

Tratamientos. Tanto el protocolo de congelación lenta como el de vitricación de embriones bovinos, se realizaron de acuerdo a lo descrito por Agka y colaboradores (1). Brevemente: Para el caso de la vitricación, los embriones fueron equilibrados a 27 \pm 2°C primero en 10% de glicerol por 5 minutos y luego transferidos a una solución 10% de glicerol más 20% de etilen glicol por 5 minutos y finalmente por 30 segundos en 25% de Glicerol más 25% de etilen glicol suplementado con 15% de suero fetal bovino y colocados en pajillas de 0.25 ml conteniendo previamente una solución de sucrosa 1M e inmediatamente después colocados en nitrógeno líquido. Los embriones fueron descongelados a 37°C, depositados en una caja de petri y agitados suavemente para ser transferidos a una solución de 0.5 y 0.25 M de sucrosa por 5 minutos. Para la congelación lenta, los embriones fueron expuestos a una solución 1.4 M de glicerol por 10 minutos y luego colocados en una pajilla de 0.25 ml y depositados en un congelador programable a -7 °C y llevados hasta -35°C a una tasa de congelación de 0.5°C por minuto para luego ser depositados en nitrógeno líquido. La descongelación se realizó a 20 °C. Luego de la remoción del crioprotector, todos los embriones fueron lavados en PBS suplementado al 15% con suero fetal bovino antes del cultivo.

Evaluación. La morfología de los blastocitos fue evaluada por microscopía óptica clasificando los

embriones en las siguientes categorías de acuerdo a su capacidad de re-expansión: Compacto, Parcialmente expandido, Expandido

Cada categoría subclasificada en: Normal, Picnótico, Fragmentado.

El número de células se evaluó por medio de microscopía de fluorescencia luego de tinción por Hoechst (19), se contaron los números de núcleos por embrión y fueron clasificados de la siguiente manera: < 40 Núcleos, 40 – 60 Núcleos, 61 – 80 Núcleos, > 80 Núcleos.

Ambos parámetros de calidad embrionaria fueron evaluados tanto al momento de la descongelación (Fase Inicial) como a las 12 horas de cultivo (Fase Final), y fueron realizados por el mismo observador.

Análisis Estadístico. Para la presente investigación se usó un Análisis Factorial de Correspondencia Simple (5,11), el cual, como instrumento particular adaptado al tratamiento estadístico de datos provenientes de variables cualitativas, responde a dos objetivos: Reducir la dimensionalidad de la información y explorar su dinámica. Mediante esta técnica se pueden apreciar similitudes y disimilitudes entre las modalidades asociadas a las diferentes variables, pudiéndose formar clases donde se condensa la información relacionada. Se emplearon como variables activas la Morfología y el Número de núcleos evaluado a partir de rangos; como variable ilustrativa, los tratamientos.

Resultados

Fase Inicial. Inmediatamente después de la descongelación de los embriones (Fase Inicial) fueron evaluados 77 embriones para el Tratamiento C y 50 para el Tratamiento V.

Como podemos observar en el Factorial de Correspondencia Simple (véase Figura 1), no se estableció diferencia entre los dos sistemas de criopreservación en cuanto a su efecto sobre la calidad embrionaria ($p > 0.05$) (datos en rojo en Figura 1). Los embriones parcialmente expandidos se caracterizaron por tener menos de 40 núcleos y en algunos casos se presentó fragmentación (datos en azul en Figura 1). Los embriones compactos y los expandidos presentaron la mayor cantidad de núcleos (61 – 80 ; >80) (datos en verde en Figura 1). El 57.29%

de los embriones sufrieron durante la criopreservación y al momento de evaluar presentaron menos de 40 núcleos. El 17.71% de los embriones presentaron más de 60 núcleos. (véase Tabla 1).

Fase Final. A las 12 horas de cultivo, posteriores al descongelamiento (Fase Final), los resultados fueron los siguientes:

Durante el proceso, 9 embriones fueron descartados por problemas en la técnica, 3 por presentar ruptura de su zona pelúcida y 9 embriones fueron extraviados, quedando dentro del análisis en definitiva, 60 embriones para el Tto C y 46 para el Tto V.

Del análisis del Factorial de Correspondencia Simple (véase Figura 2), se establece que no existió diferencia significativa entre las dos técnicas de criopreservación en cuanto a la calidad embrionaria (morfología y número de núcleos) 12 horas después del descongelamiento ($p > 0.05$) (datos en rojo Figura 2). El 36.56% de los embriones presentó más de 60 núcleos, incrementándose en un 132.7% con respecto a la Fase Inicial. (véase Tabla 2).

Los embriones con un número de núcleos mayor a 60 se caracterizaron por tener morfología expandida y en algunos casos presentaron picnosis (datos en azul Figura 2). Los embriones con un número de núcleos inferior a 40, tenían morfología compacta y en algunos casos presentaron picnosis (datos en verde Figura 2). Los embriones con un número de núcleos que oscilaba entre 40 y 60, presentan una morfología compacta y fragmentada (datos en violeta Figura 2).

Análisis Conjunto. Para saber cuál era la diferencia entre los tratamientos, se evaluaron simultáneamente la Fase Inicial y la Fase Final, encontrando lo siguiente:

El Análisis de clasificación jerárquica no permitió caracterizar alguna clase de manera clara y consistente, tanto en la fase inicial, la final, y en la evaluación conjunta (datos en rojo en Figura 3), de lo que se infiere que no existe diferencia entre las dos técnicas de criopreservación ($p > 0.05$).

Los embriones que presentaron buenas características al momento de la descongelación, mejoraron su nuclearidad durante el cultivo, todos aquellos que presentaron más de 60 núcleos a la

Tabla 1. Evaluación morfológica a la descongelación (Fase Inicial).

Variable	Congelación		Vitrificación		% Total
	n	%	n	%	
1. Morfología					
Compacto					
Normal	28	36.4	7	14.0	27.56
Picnótico	8	10.4	2	4.0	7.87
Fragmentado	1	1.3	1	2.0	1.57
Parcialmente Expandido					
Normal	27	35.0	28	56.0	43.31
Picnótico	4	5.2	5	10.0	7.09
Fragmentado	1	1.3	1	2.0	1.57
Expandido					
Normal	7	9.1	6	12.0	10.24
Picnótico	1	1.3	0	0.0	0.79
Fragmentado	0	0.0	0	0.0	0.00
Total	77	100.0	50	100.0	
2. Nuclearidad					
< 40	41	70.7	14	36.8	57.29
40 – 60	10	17.2	14	36.8	25.00
61 – 80	5	8.6	7	18.5	12.50
> 80	2	3.5	3	7.9	5.21
Total	58	100.0	38	100.0	

21 embriones clasificados según su morfología no se evaluaron para el número de núcleos.

descongelación, aumentaron su número de núcleos y algunos de los que presentaron baja nuclearidad (20%) pasaron a tener más de 60 núcleos, caracterizándose por una morfología expandida y picnótica.

El 10.83% de los embriones con morfología expandida, presentaron en las dos fases más de 60 núcleos.

Discusión

Aún cuando los embriones producidos *in-vitro* parecen ser más susceptibles al daño celular, ambos métodos de criopreservación de embriones han sido utilizados por otros grupos de investigadores logrando criopreservar embriones de varias especies a diferentes estados preimplantatorios, sin embargo, la baja sobrevivencia post-descongelamiento al parecer es una constante. De hecho, aun cuando las técnicas de congelación han logrado tasas de preñez entre 60-70% en embriones producidos *in vivo*, los resultados obtenidos en embriones producidos *in vitro* son considerablemente bajos (9), mejorando en el caso de la vitrificación (6). Nuestros resultados coinciden con lo expuesto por Kasai

Tabla 2. Evaluación morfológica a las 12 horas de cultivo (Fase Final).

Variable	Congelación		Vitrificación		% Total
	n	%	n	%	
1. Morfología					
Compacto					
Normal	7	11.7	6	13.0	12.26
Picnótico	3	5.0	4	8.7	6.60
Fragmentado	8	13.3	3	6.6	10.38
Parcialmente Expandido					
Normal	11	18.3	6	13.0	16.04
Picnótico	1	1.7	0	0.0	0.94
Fragmentado	13	21.6	11	23.9	22.64
Expandido					
Normal	15	25.0	10	21.7	23.58
Picnótico	1	1.7	2	4.4	2.83
Fragmentado	1	1.7	4	8.7	4.72
Total	60	100.0	46	100.0	
2. Nuclearidad					
< 40	26	49.1	9	22.5	37.63
40 – 60	8	15.1	16	40.0	25.81
61 – 80	7	13.2	3	7.5	10.75
> 80	12	22.6	12	30.0	25.81
Total	53	100.0	40	100.0	

13 embriones clasificados según su morfología no se evaluaron para el número de núcleos.

(12), en relación a que la sobrevivencia es una variable dependiente de ciertos factores como la raza y el estado de desarrollo. Aún cuando se conocen diferencias en cuanto a toxicidad y formación de cristales intra y extracelulares, entre otras, entre los diferentes agentes crioprotectores y componentes de los medios de congelación, nuestros resultados no arrojan diferencias significativas de un método y otro con relación a la sobrevivencia post-descongelación, ni a las alteraciones celulares generadas por cada uno de ellos, sin embargo, en trabajos anteriores, se ha logrado encontrar una mayor tasa de preñez de embriones bovinos producidos *in vitro*, sometidos al método de vitrificación comparados con aquellos que fueron congelados (1,6).

Independientemente del método de criopreservación empleado en nuestro experimento, las bajas celularidades y los procesos de fragmentación y picnosis encontrados en una alta proporción, parecieran ser consecuencia más de características propias de los embriones producidos *in-vitro* que de la técnica empleada en la criopreservación de los mismos. Sin embargo, nuestros datos no permiten realizar un análisis de dichas condiciones.

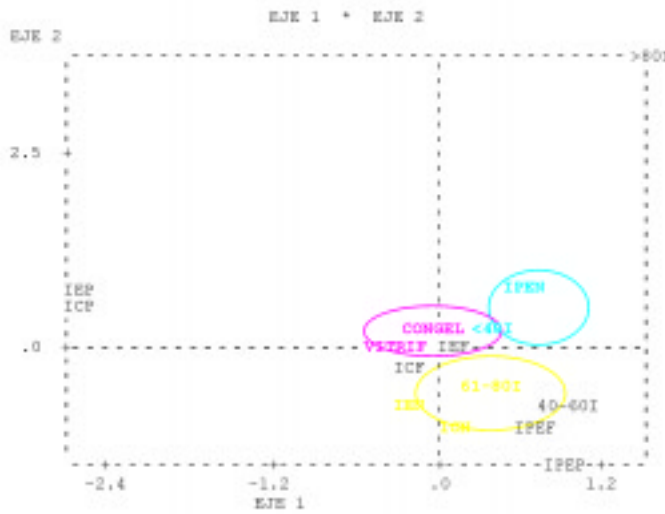


Figura 1. Factorial de correspondencia simple Fase Inicial.

IPEN. Parcialmente Expandido Normal; *IPEP.* Parcialmente Expandido Picnótico; *IPEF.* Parcialmente Expandido Fragmentado; *ICN.* Compacto Normal; *ICP.* Compacto Picnótico; *ICF.* Compacto Fragmentado; *IEN.* Expandido Normal; *IEP.* Expandido Picnótico; *IEF.* Expandido Fragmentado; <40I: Menos de 40 núcleos; 40-60I: Entre 40 y 60 núcleos; 61-80I: entre 61 y 80 núcleos; >80I: Más de 80 núcleos.

Nótese la conformación de tres clases, de acuerdo a la similitud entre las variables arrojadas por el análisis estadístico: 1) Embriones parcialmente expandidos sin alteraciones citoplasmáticas (IPEN) con menos de 40 núcleos (círculo azul); 2) Embriones expandidos (IEN) y compactos (ICN) sin alteraciones citoplasmáticas y con una nuclearidad entre 61 – 80 (círculo verde) y, 3) Similitud entre los dos tratamientos (círculo rojo).

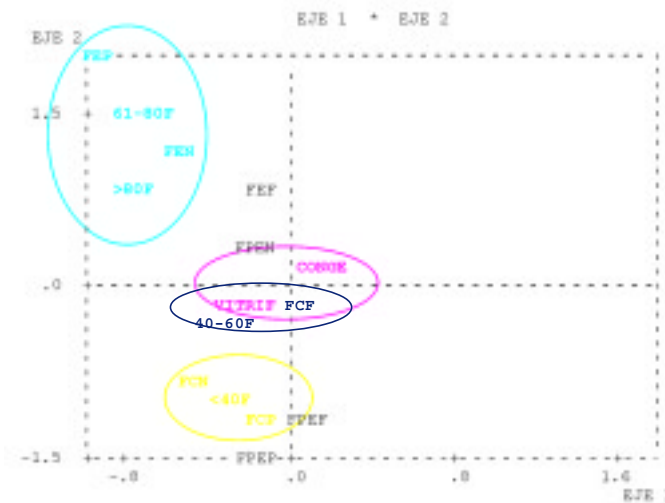


Figura 2. Factorial de correspondencia simple Fase Final.

FPEN. Parcialmente Expandido Normal; *FPEP.* Parcialmente Expandido Picnótico; *FPEF.* Parcialmente Expandido Fragmentado; *FCN.* Compacto Normal; *FCP.* Compacto Picnótico; *FCF.* Compacto Fragmentado; *FEN.* Expandido Normal; *FEP.* Expandido Picnótico; *FEF.* Expandido Fragmentado; <40F: Menos de 40 núcleos; 40-60F: Entre 40 y 60 núcleos; 61-80F: entre 61 y 80 núcleos; >80F: Más de 80 núcleos.

Nótese la conformación de cuatro clases, de acuerdo a la similitud entre las variables arrojadas por el análisis estadístico: 1) Embriones expandidos (FEN) con una nuclearidad mayor a 60 (círculo azul); 2) Embriones compactos con signos de fragmentación (FCF) con nuclearidad entre 40 – 60 (círculo violeta); 3) Embriones compactos sin alteración citoplasmática y algunos con signos de picnosis (FCN y FCP) con nuclearidad menor a 40 (círculo verde), y 4) Similitud de los tratamientos (círculo rojo).



Figura 3. Factorial de correspondencia simple Fase Inicial y Final.

Fase Inicial. *IPEN:* Parcialmente Expandido Normal; *IPEP:* Parcialmente Expandido Picnótico; *IPEF:* Parcialmente Expandido Fragmentado; *ICN:* Compacto Normal; *ICP:* Compacto Picnótico; *ICF:* Compacto Fragmentado; *IEN:* Expandido Normal; *IEP:* Expandido Picnótico; *IEF:* Expandido Fragmentado; <40I: Menos de 40 núcleos; 40-60I: Entre 40 y 60 núcleos; 61-80I: entre 61 y 80 núcleos; >80I: Más de 80 núcleos.

Fase Final. *FPEN:* Parcialmente Expandido Normal; *FPEP:* Parcialmente Expandido Picnótico; *FPEF:* Parcialmente Expandido Fragmentado; *FCN:* Compacto Normal; *FCP:* Compacto Picnótico; *FCF:* Compacto Fragmentado; *FEN:* Expandido Normal; *FEP:* Expandido Picnótico; *FEF:* Expandido Fragmentado; <40F: Menos de 40 núcleos; 40-60F: Entre 40 y 60 núcleos; 61-80F: entre 61 y 80 núcleos; >80F: Más de 80 núcleos.

Aparte de la similitud de los tratamientos (círculo rojo), el análisis estadístico no logró caracterizar ninguna clase.

Se ha sugerido que los embriones *in vitro* presentan menos celularidad que los producidos *in vivo*, quizás por procesos de apoptosis (13), alteraciones en la organización de su citoesqueleto, mayor sensibilidad a la manipulación y a la criopreservación y un detrimento en su competencia para el desarrollo posterior (14). Aún partiendo de embriones de “excelente calidad”, de acuerdo a su morfología y nuclearidad, las bajas celularidades encontradas al momento del descongelamiento, podrían deberse a la baja calidad de las blastómeras en cuanto a su organización celular, y que durante el enfriamiento, esta menor calidad conduciría a lesiones fatales en muchas de ellas. Se conoce, por ejemplo, que los embriones producidos *in vitro* presentan alteración en sus perfiles metabólicos, especialmente el oxidativo, con mayor producción de especies reactivas de oxígeno altamente lesivas para los sistemas membranales (2, 4). De igual manera, se han descrito alteraciones en los procesos de maduración nucleolar (12) quizás relacionados con la incapacidad de regular ciertos genes, como el glutatión (7), durante el

desarrollo temprano, previa a la activación del genoma propiamente dicho e incluso posterior a ella. Estas fallas estarían generando alteraciones, principalmente al nivel de citoesqueleto que los hiciera más susceptibles a las bajas temperaturas y a la manipulación.

Sin embargo, algunos embriones (17.7%) logran superar, sin sufrir daños apreciables, las condiciones impuestas por la criopreservación, lo cual sugiere cierta competencia, es así como aquellos embriones que al momento de la descongelación presentaron buenas características morfológicas y más de 60 células, en un 100% progresaron en su desarrollo bajo condiciones de cultivo. Es más, una proporción apreciable (20%) de los embriones que presentaron al momento de la

descongelación menos de 40 núcleos sin presentar alteración en su morfología, mejoraron su nuclearidad con el cultivo. Podría pensarse que aún a expensas de la pérdida de blastómeras, quizás como consecuencia de procesos apoptóticos conducentes a la eliminación de células afectadas y por lo tanto no viables, algunos embriones cuentan con la maquinaria necesaria para sobrepasar estas inclemencias, no solo restableciendo su nuclearidad, sino progresando en el desarrollo bajo las mismas condiciones artificiales impuestas que los que no lo hacen.

Se hace necesario adelantar estudios que intenten caracterizar posibles factores de adquisición de competencia para soportar estos procesos.

Summary

Evaluation of two cryopreservation methods on quality of in vitro-produced bovine embryos

The aim of this study was to compare two cryopreservation methods, Cooling (Standard method) and Vitrification, on quality (morphology and nuclearity) of bovine in-vitro produced embryos. Good quality bovine blastocysts (90-100 cells) were preserved using Cooling (n=77) and Vitrification (n=50) protocols and then evaluated by optic microscopy at thawing and after 12 hours of culture after thawing. Morphology and nuclearity were registered: Compacted, Partially Expanded, Expanded, Picnotic and Fragmented; <40, 40-60, 61-80 and >80 nucleus. At thawing, compact and expanded embryos showed a greater amount of nucleus (61-80;<80) whereas partially expanded embryos had <40 nucleus. 57.3% of embryos showed <40 nucleus and 17.7% more than 60 nucleus. At 12 hours of culture after thawing, 36.6% of embryos showed more than 60 nucleus, improving nuclearity on 132.7% with culture. There was not any difference between cryopreservation techniques employed (p>0.05) neither at thawing nor after 12 hours culture. Evaluating both moments, all of embryos that has showed more than 60 nucleus improved their nuclearity during culture and some of them (20%) that has showed a low nuclearity become to have more than 60 nucleus, and although they got expanded, they showed picnosis. <40 nucleus embryos showed compactation and picnosis, moreover, 40-60 nucleus embryos become expanded although, they revealed picnosis and fragmentation. Rather than cryopreservation method, cellular disturbance may be due to certain in-vitro embryo features, because some of them are more resistant. It is necessary to make new works to characterize in-vitro embryo factors that make them more competent to support cryopreservation.

Key words: cooling, IVF, vitrification

Referencias

- 1 Agka Y, Monsosn RL, Northey DL, Schaefer DM and Rutledge JJ. Post-thaw pregnancy rates comparison of vitrified and frozen in-vitro produced bovine embryos. *Theriogenol.* 1996; 45(1): 175. (Abstract)
- 2 Betteridge KJ. Phylogeny, Ontogeny and embryo transfer. *Theriogenology.* 1995; 44: 1061 – 1098
- 3 Camargo O, *et al.* Obtención de embriones bovinos in vitro. *Rev Col Cienc Pec.* 1997; 10 suplemento. Memorias IV ENICIP.
- 4 Camargo O, Westhusin M, Estrada L, Gallego M, Olivera-Angel M. Effects of superoxide dismutase and thioredoxin on bovine Embryo development in vitro. *Theriogenol.* 1998; 49 (1) 280 (Abstract)
- 5 Crivisqui EM. Análisis factorial de correspondencias. Laboratorio de Informática Universidad Católica de Asunción (ed.). Asunción, Paraguay. 1993. 302p.
- 6 Delval A, Ectors FJ, Touati K, Remy S, Beckers JF *et al.* Vitrification of bovine embryos produced in vitro: survival, hatching and pregnancy rates. *Theriogenol.* 1996; 45: 178. (Abstract)

- 7 Edwards JL, King WA, Kawarsky SJ, Ealy AD. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective role of HSP70 and glutathione. *Theriogenol.* 2001; 55 (1): 209–223.
- 8 Han M, Yamashina H, Koyama N, Lee K, Fukui Y. Effects of quality and developmental stage on the survival of ivf-derived bovine blastocysts cultured in vitro after freezing and thawing. *Theriogenol.* 1994; 42:645–654.
- 9 Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, *et al.* Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenol.* 1995; 43: 141-152.
- 10 Hochi S, Semple E, Leibo S. Effect of cooling and warming rates during criopreservation on the survival of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenol.* 1996; 46: 837–847.
- 11 Johnson DE. Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. Internacional Thomson Editores. New York USA. 2000. 485p.
- 12 Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mamalian embryos. *Anim Reproduc Sci.* 1996; 42:67-75.
- 13 Lonergan P. Growth of preimplantation bovine embryos. *Acta Vet Scand.* 1994; 35:307-320.
- 14 Long CR, *et al.* Dual labeling of the citoskeleton and DNA strand breaks in porcine embryos produced in vivo and in vitro. *Mol Reprod and Develop.* 1998; 51: 59-65.
- 15 Massip A, Mermillod P, Van Langendonck A, Touze JL, Dessy F. Survival and viability of bovine blastocysts produced in vitro, fresh and freeze-thawed. *Reprod Nut Dev.* 1995; 35: 3–10.
- 16 Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: Implicatiuons for their crriopreservation. *Human Reprod.* 1995; 10(11):3004–3011.
- 17 Mazur P. Fundamental aspects of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos. IX International Congress of Animal Reproduction & A. I. 1980, Vol Y Plenary Sessions General Reports. 16–20 June Spain, Madrid. 99–114
- 18 Naitana S, Loi P, Ledda S, Cappai P, Dattena M, *et al.* Effect of biopsy and vitrification on the in vitro survival of bovine embryos in differents stages of development. *Theriogenol.* 1996; 46: 813–824.
- 19 Olivera-Angel M. De la fertilización in vitro al transplante de los embriones Manual de Laboratorio. Universidad de Antioquia, Medellín. 1994, Ed. Copiyepes. 40p.
- 20 Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Factors affecting survival rates of in vitro produced embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim Reprod Sci.* 1996; 45: 191–200.
- 21 Vajta G, Hyttel P, Callesen H. Morphological changes of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification in straw direct rehydration and culture. *Mol Reprod and Dev.* 1997; 48: 9–17.
- 22 Vajta G. Vitrification of bovine oocytes and embryos. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60: 357-364.