

Capítulo LXXXII

Criopreservación de embriones bovinos producidos *in vitro*

Francisco J. Báez Contreras
Carmen Díez Monforte

La producción *in vitro* de embriones proporciona un recurso de gran ayuda para el estudio del desarrollo temprano de los mamíferos y es una herramienta inestimable para el desarrollo de otras disciplinas como la transgénesis y transferencia nuclear (Lonergan & Fair, 2008). Tras superarse las dificultades iniciales en el desarrollo de la técnica, hoy en día, muchos laboratorios producen embriones *in vitro* (Meirelles *et al.*, 2004), aunque éstos presentan una calidad más baja que los obtenidos *in vivo*.

La calidad intrínseca de los ovocitos de partida es el factor clave que determina la proporción de blastocistos obtenidos. Por su parte, el periodo de post-fecundación es determinante en la calidad de los embriones producidos, evaluada en aspectos como el número de células y su diferenciación, la expresión génica, la supervivencia a la criopreservación o la capacidad para dar lugar a gestaciones (Lonergan *et al.*, 2006).

En las últimas décadas, la criopreservación de embriones ha sido una herramienta útil para interrumpir y controlar el ciclo reproductivo de especies de interés zootécnico. La criopreservación de embriones supone una ralentización de su metabolismo (manteniendo su viabilidad y funcionalidad) hasta un punto próximo a su detención, momento del que puede ser recuperado con posterioridad (Fabri *et al.*, 2000). Sin embargo, debido a los sistemas de producción, los embriones producidos *in vitro* (EPIV) presentan una acusada sensibilidad a los protocolos de criopreservación, hecho que dificulta la difusión de esta tecnología en las explotaciones de aquellos países en que la disponibilidad de receptoras es un factor limitante.

El presente Capítulo pretende ofrecer una idea de cuáles son los factores que limitan la supervivencia de los EPIV a la criopreservación, y cuáles son las más recientes líneas de trabajo en el campo de la criobiología embrionaria bovina.

CARACTERÍSTICAS DE LOS EPIV

El desarrollo *in vitro* de embriones ha supuesto una fuente constante de dificultad, particularmente en el caso de los embriones producidos por maduración, fecun-

dación y posterior cultivo *in vitro* (MIV/FIV/CIV). Es difícil determinar si el bajo rendimiento de la técnica (30-40% de blastocistos, con relación al número de ovocitos puestos en maduración) es debido directamente a unas condiciones de cultivo sub-óptimas o si es el resultado de una reducción de la competencia para el desarrollo de los ovocitos madurados y fecundados *in vitro*, ya que parece ser que existen factores moleculares, celulares y/o genéticos, intrínsecos al ovocito y/o al embrión, determinantes del potencial de desarrollo (Loneragan *et al.*, 2006). De esta forma, en muchas ocasiones se combinan una reducción en la competencia para el desarrollo y/o condiciones sub-óptimas de cultivo para producir un retraso en los embriones, anomalías en el desarrollo y una reducción de la viabilidad.

El cultivo *in vitro* constituye la última y más larga etapa en el proceso de producción de embriones. Los embriones son mantenidos entre 7 y 8 días en el caso del bovino, en un medio que debe proporcionarles las mejores condiciones para su crecimiento, favoreciendo la división celular y el normal desarrollo hasta la formación del blastocite, en la fase de blastocistos (Corrêa *et al.*, 2008). La utilización de unos medios de cultivo u otros tiene un efecto significativo sobre la calidad del embrión. Estas condiciones de cultivo se traducen la producción de embriones sustancialmente diferentes a los que obtenemos tras la superovulación y lavado de hembras donantes.

El estudio durante las últimas dos décadas de la concentración idónea de iones y cationes y sustratos metabólicos necesarios para el desarrollo de embriones pre-implantación ha dado lugar a la formulación de medios de cultivo que incorporan suplementos y/o factores que mejoran el desarrollo embrionario (Wang *et al.*, 2005; Gilchrist y Thompson, 2007). No obstante, la capacidad de los embriones para desarrollarse en un medio concreto no es necesariamente un indicativo de una preferencia por un ambiente determinado, sino que puede ser también reflejo de su capacidad adaptativa ante unas condiciones artificiales sub-óptimas.

El bloqueo del desarrollo embrionario durante el cultivo *in vitro* ha sido descrito en varias especies. En bovinos se manifiesta en el cuarto ciclo celular, en el quinto para el conejo, tercero en humanos y segundo en el ratón (Warzych *et al.*, 2007). Este bloqueo coincide con el inicio de la activación del genoma embrionario y la transcripción de nuevo RNAm (Sagirkaya *et al.*, 2007). La razón de esta alteración del desarrollo puede ser debida al agotamiento/ausencia de factores de transcripción o daños causados por el ambiente (Meirelles *et al.*, 2004). Por otro lado, se sugiere que la síntesis proteica y la acumulación de transcritos de RNAm durante el desarrollo del ovocito son determinantes para la activación y posterior desarrollo embrionario (Figura 1) (Loneragan *et al.*, 2003).

Los EPiV tienen una velocidad de desarrollo diferente y poseen un citoplasma más oscuro y una densidad menor como consecuencia del alto contenido de lípidos, aspecto muy relacionado con el medio de cultivo (Lim *et al.*, 2007). Otra de las características es que estos embriones también muestran diferencias en el metabolismo con relación a los embriones producidos *in vivo*, así como en los patrones de expresión génica, criterio utilizado para predecir el potencial de desarrollo de embriones producidos *in vivo* e *in vitro* (Sirard *et al.*, 2006). Varios estudios han demostrado que la abundancia relativa de varios transcritos de RNAm y la resistencia a la criopreservación se

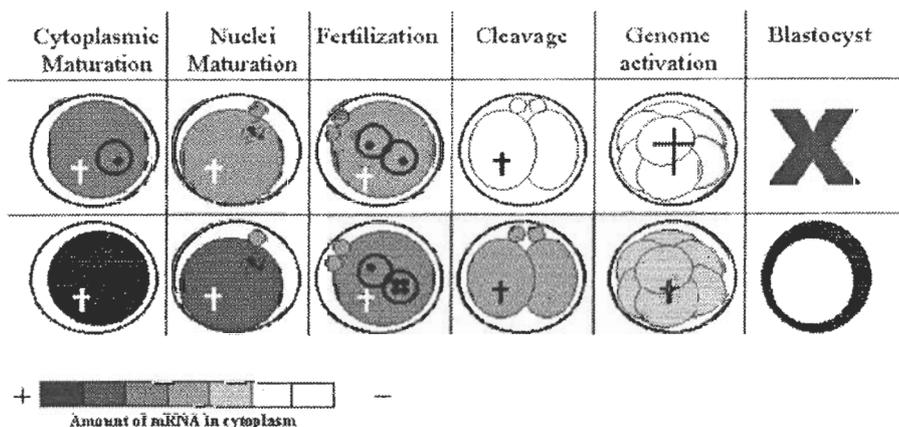


Figura 1. Representación esquemática de la cantidad de RNAm correspondiente a ovocitos de baja (línea de arriba) y moderada (línea abajo) calidad, mostrando el decaimiento de la cantidad de RNAm a medida que el embrión avanza hasta el estadio de blastocisto. La cruz al final de la línea de arriba representa el bloqueo de desarrollo embrionario (tomado de Mairalles *et al.*, 2004).

ven afectadas por el medio de cultivo empleado, y más concretamente por el tipo de suplemento proteico (Lonergan *et al.*, 2003; Dhali *et al.*, 2009).

El desarrollo de técnicas de tinción diferencial ha permitido asimismo determinar la calidad de los blastocistos en función del número de células y de su distribución en la Masa Celular Interna (MCI) y el trofoectodermo (TE) (Lim *et al.*, 2007). Aunque el número de células totales de los EPIV es comparable al de los obtenidos *in vivo*, su distribución y patrón de diferenciación presenta diferencias, con un número de células en la MCI significativamente más bajo en el caso de los EPIV (Iwasaki *et al.*, 1990).

Por último, los EPIV presentan una alta incidencia de alteraciones cromosómicas y apoptosis (Lonergan, 2006; Wang *et al.*, 2008), así como una mayor sensibilidad de la zona pelúcida a la acción de la pronasa. Todas las características citadas hasta el momento tienen importantes repercusiones en la viabilidad de los EPIV. Las más importantes son la mayor sensibilidad a los efectos de las bajas temperaturas y los menores índices de gestación tras la transferencia a receptoras. Ambos aspectos son de importancia capital para rentabilizar el coste que supone la aplicación de estas tecnologías en las explotaciones pecuarias.

CONSECUENCIAS PARA LA CRIOPRESERVACIÓN

Como ya hemos comentado, los embriones bovinos producidos *in vitro* son menos crío-tolerantes que los producidos *in vivo*, especialmente en estadios anteriores al de blastocisto (Seidel, 2006; Abdalla *et al.*, 2010). La supervivencia del embrión bovino a los protocolos de criopreservación depende de varios factores como son la técnica empleada, la duración de exposición del crioprotector y su concentración, así como la forma de eliminarlo tras la descongelación (Fabri *et al.*, 2000; Shirazi *et al.*, 2009). Otros factores relacionados son las condiciones de cultivo (Saragusty & Arav, 2011),

la calidad, el estadio y edad del embrión (Abdalla *et al.*, 2010), además de la composición y estructuras celulares (Saragusty & Arav, 2011).

El procedimiento de la criopreservación comprende una exposición inicial del embrión a los agentes crioprotectores, congelación, almacenamiento, descongelación y finalmente la dilución y retirada de los agentes crioprotectores, volviendo a un ambiente fisiológico que le permita continuar su desarrollo. Durante el proceso de congelación, las células embrionarias experimentan modificaciones en su volumen, debido a las diferentes presiones osmóticas existentes entre las soluciones intracelulares y extracelulares. Estos cambios afectan a varios parámetros de importancia para la supervivencia del embrión, incluyendo la integridad de la membrana plasmática (Arav *et al.*, 1996; Horvath & Siedel, 2006; Elnahas *et al.*, 2010) y la de sus orgánulos celulares (Agca, 2000). La exposición de la membrana plasmática a las bajas temperaturas durante la congelación determina una alteración de la fase de transición, de forma que su estructura y función se ven alteradas (Zeron *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2005; Gardner *et al.*, 2007). La primera consecuencia negativa para la membrana es una modificación en su permeabilidad, lo que determina cambios en el flujo del agua y de los crioprotectores a través de la misma.

Los métodos de criopreservación se clasifican de acuerdo a la velocidad de enfriamiento-descongelación, el tipo y la concentración de crioprotector y la respuesta del embrión en métodos de equilibrio y no equilibrio (Rall, 1992). El objetivo principal del método de equilibrio (congelación clásica) es el de controlar la velocidad de enfriamiento del tal forma que a medida que desciende la temperatura se produzca la penetración del crioprotector al interior de la células embrionarias, alcanzándose un equilibrio osmótico; la tasa de enfriamiento suele oscilar entre 0,2 y 0,5°C/minuto (dependiendo de las especies) y requiere el uso de un congelador programable (Shaw *et al.*, 2000).

Los métodos de no equilibrio (vitrificación) son procedimientos por los que tras un enfriamiento ultrarrápido, se produce un incremento en la viscosidad del medio que contiene el embrión (o la célula), formándose un estado sólido pero sin cristalización (estado vítreo). La prevención del fenómeno de cristalización se consigue utilizando elevadas concentraciones de crioprotectores y altas velocidades de enfriamiento y calentamiento (Vajta, 1997). La aceleración de la velocidad de los cambios de temperatura ofrece dos ventajas: permite disminuir el tiempo de contacto entre el embrión y los agentes crioprotectores (con el consiguiente beneficio derivado de la disminución de los efectos tóxicos y osmóticos) y reduce también el riesgo de que se produzcan lesiones por la exposición a bajas temperaturas debido al rápido paso por la zona de "temperatura crítica" (Isachenko *et al.*, 1998). Se evitan así los efectos deletéreos producidos por la formación de cristales de hielo intracelulares.

Las células sufren una deshidratación osmótica previa al enfriamiento, por pases previos en una solución altamente concentrada de crioprotectores. Las soluciones de vitrificación pueden contener dimetilsulfoxido (DMSO), polietilenglicol (PEG), etilenglicol (EG), glicerol, solos o en combinación, y en concentraciones muy elevadas. La adición de disacáridos a los medios de criopreservación favorece la estabilidad de la membrana plasmática durante el proceso de vitrificación y desvitrificación (Liebermann & Tucker, 2002).

Rall & Fahy (1985) fueron los primeros en describir el protocolo de vitrificación para embriones mamíferos. Hasta la fecha, la vitrificación ha sido el método de elección en el caso de los embriones producidos *in vitro*, puesto que es un método con buenos resultados de supervivencia, simple, y que, además, no requiere equipamiento de congelación controlada (Vajta, 1997; Vajta *et al.*, 2005). Los resultados de supervivencia *in vitro* de los EPIV tras vitrificación/desvitrificación presentan una elevada heterogeneidad. Aunque varios autores presentan datos que oscilan entre el 70% y el 80% (Gómez *et al.*, 2008; Shirazi *et al.*, 2009; Siqueira *et al.*, 2010), otros grupos citan resultados menos optimistas, al reportar un 35% de supervivencia valoradas a las 72 h de desvitrificación (Yu *et al.*, 2010). En fechas recientes varios autores proponen la utilización de los sistemas de congelación clásica (Yu *et al.*, 2010; Pryor *et al.*, 2011).

Los resultados referidos a porcentajes de gestación tras la transferencia de estos embriones criopreservados a hembras receptoras son igualmente dispares, y frecuentemente realizados sobre un número de receptoras relativamente bajo (Cuadro 1).

Cuadro 1
Índices de gestación y nacimientos, tras la transferencia de embriones bovinos producidos *in vitro* criopreservados

Criopreservación	Soporte/crioprotectores	Embriones transferidos	Gestación	Nacidos (%)	Referencia
Congelación lenta	Pajuelas 250 μ L/Glicerol	10	42%	NI	Hasler <i>et al.</i> (1995)
	Pajuelas 250 μ L/1,4 M Glicerol	17	41%	7 (77)	Agca <i>et al.</i> (1998)
	Pajuelas 250 μ L	418	44,7%	NI	Dochi <i>et al.</i> (1998)
	Pajuelas 250 μ L/Glicerol	22	4,8%	NI	Ambrose <i>et al.</i> (1999)
Vitrificación	Pajuelas 250 μ L (25% EG +25%DMSO)	20	35%	6 (30)	Vajta (1997)
	Pajuelas 250 μ L (20% Glicerol + "0% EG)	16	63%	8 (67)	Agca <i>et al.</i> (1998)
	OPS	20	6,5%		Al-Katanani <i>et al.</i> (2002)
	OPS (16,5% EG + 16,5% DMSO)	7	27,7%	NI	Block <i>et al.</i> (2010)

OPS: Open Pulled Straw (Pajuela abierta y estirada); EG: Etilenglicol; DMSO: Dimetilsulfoxido. NI: No indican.

Los índices de gestación oscilan entre el 27% (Block *et al.*, 2010) hasta el 40% (Agca *et al.*, 1998); en cualquier caso, los resultados fueron inferiores a los obtenidos tras la transferencia de EPIV frescos (Moore *et al.*, 2007).

Las estrategias actuales se orientan a:

1. La optimización de los protocolos de vitrificación mediante el diseño de nuevos soportes que permitan la modificación de la relación superficie de la célula/volu-

men de la solución de vitrificación, y con el fin de lograr un incremento de las velocidades de enfriamiento y calentamiento (gradiente térmico),

2. La mejora de la calidad embrionaria mediante la utilización de aditivos durante el cultivo de los embriones, o en las soluciones de vitrificación.

Así, los primeros protocolos de vitrificación en pajuela clásica, han sido sustituidos por otro tipo de soportes que permiten un más rápido intercambio térmico, mejorándose las tasas de supervivencia post-desvitrificación. Surgen de esta forma métodos como el Open Pulled Straw (OPS) (Vajta *et al.*, 1998), superficie sólida (SSV, Akkoc *et al.*, 2010), cryotip (Conaghan & Fischer, 2010), dispositivo de vitrificación por microfiltración de membrana (MFMV, Matsunari *et al.*, 2010), cryotop (Kuwayama *et al.*, 2000), tamaño mínimo de la gota (MDS, Arav & Zeron, 1996) y fiberplugs (Wang *et al.*, 2009).

La mejora de la calidad de los embriones a criopreservar pasa por el establecimiento de condiciones de cultivo que den lugar a embriones con características lo más similares posibles a las de sus homólogos obtenidos *in vivo*. Por ejemplo, la eliminación del suero fetal bovino (FCS) y su sustitución por albúmina sérica (BSA) incrementa la supervivencia embrionaria a la vitrificación (Gómez *et al.*, 2008). Otros procedimientos, como la retirada de los lípidos citoplasmáticos (Diez *et al.*, 2001), el uso de citocalasina B (CB) (Dobrinsky *et al.*, 2000), y más recientemente la aplicación del método de eclosión asistida por laser (laser assisted hatching, LAH) en combinación con la CB y delipidación (Pryor *et al.*, 2011) han demostrado mejorar la supervivencia de los EPIV a la criopreservación.

Con el avance de la biotecnología, se desarrollan nuevos métodos para el estudio y entendimiento de los problemas derivados de la criopreservación. El desarrollo de estrategias para reducir el estrés asociado con la criopreservación es fundamental para comprender mejor las causas de bajos índices de supervivencia tras la descongelación. La aplicación de una Presión Hidrostática Subletal (HHP: High Hydrostatic Pressure) ha surgido durante los últimos cinco años como una alternativa para intentar paliar la sensibilidad de ovocitos, espermatozoides y embriones a la criopreservación. El efecto de la exposición de la célula a la presión le generaría un estrés responsable de una serie de cambios que inducirían a la adaptación e incremento de la supervivencia a la criopreservación (Pribenszky *et al.*, 2011). Este mecanismo adaptativo podría ser debido a la producción de proteínas chaperonas de la familia de las Heat Shock Proteins (Pribenszky *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2008).

El nivel de presión aplicada y su duración dependen de la especie y del tipo de gameto, o del estadio de desarrollo del embrión. Por ejemplo, los ovocitos porcinos madurados *in vitro* pueden soportar la presión de sólo 20 MPa (Veinteava Millonésima de un Pascal), mientras que los blastocistos de ratón pueden sobrevivir a una presión de hasta 90 MPa durante 30 min (Pribenszky *et al.*, 2005, Du *et al.*, 2008). Los índices de supervivencia post-criopreservación mejoraron en ovocitos porcinos y bovinos (Du *et al.*, 2008, Pribenszky *et al.*, 2008), en blastocistos de ratón y espermatozoides de cerdo tras el tratamiento de presión (Pribenszky *et al.*, 2005). El tratamiento de embriones bovinos producidos *in vitro* a 80 MPa durante 45 minutos, mejoró su supervivencia tras congelación/descongelación (Pribenszky *et al.*, 2005). Resultados simila-

res fueron obtenidos en embriones bovinos tras vitrificación, y tras un tratamiento de 60 MPa durante 1 hora. El tratamiento de presión también incrementó la calidad de embriones ovinos, al disminuir el número de núcleos picnóticos en los embriones vitrificados (Bogliolo *et al.*, 2010).

El tratamiento HHP puede inducir cambios en la transcripción de genes de varias familias en diversas especies. Existen datos que indican que determinados genes relacionados con rutas y eventos metabólicos particulares como el estrés oxidativo (SOD: superóxido dismutasa y GPX4: catalasa-glutation peroxidasa), el estrés calórico (HSPA1A) o el metabolismo de lípidos (SC4MOL) son inducibles por la elevada presión hidrostática y también pueden promover protección al embrión frente a la criopreservación (Siqueira *et al.*, 2010; Kuzmany *et al.*, 2011). Estos autores detectaron un incremento significativo ($p < 0,05$) de la tasa de re-expansión y eclosión post-desvitrificación en EPIV sometidos a un tratamiento HHP (60MPa, 1h), con una ó dos horas de equilibrio antes de la vitrificación. El periodo de equilibrio tras el tratamiento es crucial y parece beneficiar al embrión tras el tratamiento con HHP, al incrementar su tolerancia a nuevos episodios estresantes, como los relacionados con la congelación/descongelación (Siqueira *et al.*, 2010). Así, la expresión de los genes analizados mostró una tendencia general a incrementar después de una hora del periodo de equilibrio previa a la vitrificación. La HHP es pues una técnica que promete seguir proporcionando datos interesantes sobre el comportamiento de gametos y embriones ante las bajas temperaturas, aunque todavía es necesario profundizar en cuáles pueden ser sus mecanismos de actuación.

A pesar del progreso significativo experimentado durante los últimos años en la criopreservación de embriones de mamíferos, muchos de los eventos moleculares y bioquímicos en los que se basan estas tecnologías no están del todo aclarados. Hoy la vitrificación parece sustituir a los antiguos protocolos de congelación lenta, al mostrar alentadores porcentajes de supervivencia. La vitrificación debe ser aceptada como una alternativa real, viable, segura y eficiente para el abordaje de la criopreservación de embriones *in vitro*. No obstante, no debemos dejar de lado recientes revisiones del problema que abordan nuevos protocolos de congelación lenta en bovinos (Akiyama *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Pryor *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

La decisión sobre cuál es el método de elección para una muestra concreta, un embrión bovino producido *in vitro* en nuestro caso, deberá descansar sobre los índices de desarrollo *in vitro*, pero sobre todo *in vivo*, obtenidos en la fase de experimentación, así como en la posibilidad de aplicar la técnica en condiciones prácticas de campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla H, Shimoda M, Hara H, Morita H, Kuwayama M, Hirabayashi M, Hochi, S. 2010. Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. *Theriogenology* 74: 1028-1035.
- Agca Y. 2000. Cryopreservation of Oocyte and Ovarian Tissue. *Ilar Journal*. 41: 207-220.

Agca Y, Monson R, Northey D, Peschel D, Schaefer D, Rutledge J. 1998. Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology* 50: 129-145.

Akiyama K, Kobayashi J, Sato Y, Sata R, Ohashi M, Sasaki E, Oda Y, Ogawa Y, Ueda S, Nabenishi H., Matoba S. 2010. Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in-straw dilution. *Anim Sci J* 81, 461-466.

Al-Katanani Y, Drost M, Moson R, Rutledge C, Block W, Hansen P. 2002. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 58: 171-182.

Ambrose J, Drost M, Monson R, Hansen P. 1999. Efficacy of timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos to increase pregnancy rates heat-stressed dairy cattle. *J Dairy Sci* 82: 2369-2376.

Arav A, Zeron Y, Leslie S, Behboodi E, Anderson G, Crowe, J. 1996. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology* 33: 589-599.

Block J, Bonilla L, Hansen P. 2010. Efficacy of *in vitro* embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J Dairy Sci* 93: 5234-5242.

Bogliolo L, Ariu, F, Ucchedd S, Strina A, Rosati I, Zedda M, Leedda S. 2010. High hydrostatic pressure treatment improves the quality of *in vitro*-produced ovine blastocysts. *Repr. Fert. Dev.* In press.

Chenoweth P. 2007. Influence of male on embryo quality. *Theriogenology* 68: 308-315.

Conaghan J, Fischer E. 2010. Human blastocyst vitrification and warming: 3 years experience using the cryotip. *Cryo The first International Congress on Controversies in cryopreservation of stem cell, reproductive cell, tissue & organs.* Abstracts. A6.

Corrêa G, Rumpf R, Mundim T, Franco M, Dode M. 2008. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos effect in production and expression of gene related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci* 104: 132-142.

Dhali A, Anchamparathy V, Butler S, Pearson R, Mullarky I, Gwazdauskas F. 2009. Effect of droplet vitrification on development competence, actin cytoskeletal integrity and gene expression in *in vitro* cultured mouse embryos. *Theriogenology* 71: 1408-1416.

Diez C, Heyman Y, Le Bourhis D, Guyader-Joly C, Degrouard J, Renard J. 2001. Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: Effect on further development and consequences for freezability. *Theriogenology* 55: 923-36.

Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod*, 62:564-70.

Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshiba N, Kano N, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Kanashima T, Inohae S. 1998. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 49: 1051-1059.

Du Y, Pribenszky C, Molnár M, Zhang M, Yang X, Kumayama M, Pedersen A, Villemoes K, Bolnd L, Vajta G. 2008. High hydrostatic pressure: a new way to improve *in vitro* developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. *Reproduction*, 153: 13-17.

Elnahas A, Alcolak E, Abu E, Elnahas T, Elnahas K, Palapelas V, Diedrich K, Al-Hasani S. 2010. Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: An overview. *Middle East Fert J* 15: 2-9.

- Fabbi R, Porcu E, Marsella T, Primavera M, Rocchetta G, Ciotti P, Magrini O, Sacchioli N, Venturoli, Flamigni C. 2000. The technical aspects of Oocyte Cryopreservation. *Mol Cell Endocrin* 169: 39- 42.
- Gardner D, Sheehan C, Rfienzi L, Katz-Jaffe M, Larman M. 2007. Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures. *Theriogenology* 67: 64-72.
- Gilchrist R, Thompson J. 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology* 67: 6-15.
- Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M, Caamaño J, Hidalgo C, Morán E, Facal N, Díez C. 2008. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology* 69: 1013-1021.
- Horvath G, Siedel G. 2006. Vitrification of bovine oocytes alter treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. *Theriogenology* 66: 1026-1033.
- Hou YP, Dai YP, Z SE, Zhu HB, Wu TY, Gong GC, Wang HP, Wang L, Liu Y, Li R, Wan R, Li N. 2005. Bovine oocytes vitrified by open pulled straw method and used for sometic cell cloning supported development to term. *Theriogenology* 64: 1381-1391.
- Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Sánchez F, Grishchenko V. 1998. Vitrification of immature porcine Oocytes: Effects of Lipid Droplets, Temperature, Cytoskeleton, and Addition and Removal of Cryoprotectant. *Cryobiology* 36: 250-253.
- Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Fertil* 90: 279-284.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. 2003. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62:1186-1197.
- Kuzmany A, Havlicek V, Wrenzycki Ch, Wilkening S, Brem G, Besenfelder U. 2011. Expression of mRNA, before and after freezing, in bovine blastocysts cultured under different conditions. *Theriogenology* 75: 482-494.
- Lalova H, Lopatarova M, Cech S, Hlavicova, J. 2010. *In vitro* survival of bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* after vitrification in open pulled straws. Cryo The first International Congress on Controversies in cryopreservation of stem cell, reproductive cell, tissue & organs. Abstracts. B1.
- Liebermann J, Tucker M. 2002. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potencial after vitrification. *Reproduction* 124 (4): 483-489.
- Lim K, Jang G, Ko K, Lee W, Park H, Kim J, Lee S, Hwang W, Lee B, Kang S. 2007. Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* 67: 293-302.
- Lonergan P. 2006. Influence of oocyte origin and embryo culture condition on gene expression and development outcome in cattle. *J Reprod Dev.* 52 (Suppl): S45-53.
- Lonergan P, Fair T. 2008. *In vitro*-produced bovine embryos – Dealing with the warts. *Theriogenology* 9: 17-22.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Dom Anim.* 38, 259-267.

Matsunari H, Ikezawa Y, Nakano K, Ochiai K, Hagiwara Y, Sasayama N, Yoshikawa Y, Shirasu A, Takahashi M, Nagashima H. 2010. Cryopreservation of mouse embryos using a microfiltration membrane vitrification (MFMV) device. Cryo The first International Congress on Controversies in cryopreservation of stem cell, reproductive cell, tissue & organs. Abstracts. B3.

Meirelles F, Caetano A, Watanabe Y, Ripamonte P, Carambula S, Merighe G, Garcia S. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. Anim Reprod Sci 82-82: 13-20.

Moore K, Rodríguez-Sallaberry C, Kramer J, Johnson S, Wroclawska E, Goicoa S, Niasari-Naslaji A. 2007. *In vitro* production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. Theriogenology 68: 1316-1325.

Pribenszky C, Siqueira E, Molnár M, Ulrich P, Barbosa C, Hatamoto P, Santos C. 2005. Pressure assisted cryopreservation: a novel possibility for IVP bovine blastocys cryopreservation. Reprod Dom Anim 40: 338.

Pribenszky C, Vajta G, Molnár M, Du Y, Lin L, Bolund L, Yovich J. 2011. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. In press, 11 page.

Pryor J, Looney C, Rom S, Kraemer D, Long C. 2011. Cryopreservation of *in vitro* produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. Theriogenology 75: 24-33.

Rall W. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. Anim Reprod Sci 28: 237- 245.

Rall W, Fahy G. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature 313: 573-575.

Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First N, Parrish J, Memili E. 2007. Development potencial of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. Anim Reprod Sci 101: 225-240.

Saragusty J, Arav A. 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. Reproduction 141: 1-9.

Seidel J. 2006. Modifying oocytes and embryos their improve their cryopreservation. Theriogenology 65: 228-35.

Shaw J, Oranratnachai A, Trounson A. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology 53: 59-72.

Shirazi A, Nazari H, Ahmadi E, Heidari B, Shams-Esfandabadi N. 2009. Effect of culture systems on survival rate of vitrified bovine embryos produced *in vitro*. Cryobiology 59: 285-290.

Siqueira E, Caixeta E, Pribenszky C, Mohar M, Hamos A, Franco M, Rumpt R. 2010. Vitrification of bovine pre-treated with sublethal hydrostatic pressurte stress: evaluation of post-thaw *in vitro* development and gene expression. Article in press in Reproduction, Fertility and Development, 13 page.

Sirard M, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality, Theriogenology 65: 126-136.

Vajta G. 1997. Vitrification of bovine oocytes and embryos. Embrio Transfer Newsletter. 15 (12): 12-18.

- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth P, Jacobsen T, Greve T, Callesen H, Nagashima H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification; a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51: 53-58.
- Wang S, Cowan C, Chipperfield H, Powers D. 2005. Gene expression in the preimplantation embryo: *In vitro* developmental changes. *Reprod Biom Online*. 10: 607-616.
- Wang X, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. 2009. Live offspring from vitrified blastocysts derived from fresh and cryopreserved ovarian tissue grafts of adult mice. *Reproduction* 138: 527-535.
- Wang Z, Wang W, Yu S, Xu Z. 2008. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. *Anim Reprod Sci* 105: 292-301.
- Warzych E, Peippo J, Szydlowski M, Lechniak D. 2007. Supplements to *in vitro* maturation media affect the production of bovine blastocysts and their apoptotic index but not the proportions of matured and apoptotic oocytes. *Anim Reprod Sci* 97: 334-343.
- Yu X, Deng W, Liu F, Li Y, Li X, Zhang Y, Zan L. 2010. Closed pulled straw vitrification of *in vitro*-produced and *in vivo*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 73:474-479.
- Zeron Y, Tomczak M, Crowe J, Arav A. 2002. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology* 45: 143-152.