

EMBRIONES OVINOS VITRIFICADOS MEDIANTE UNA TÉCNICA "ONE STEP" PRODUCIDOS EN DOS ESTACIONES

SHEEP EMBRYOS VITRIFIED USING A "ONE STEP" TECHNIQUE PRODUCED IN TWO SEASONS

Juárez-Pérez, A.¹; Domínguez-Rebolledo, Á.²; Pinzón-López, L.¹; Aguilar-Urquiza, E.¹; Ortiz-de la Rosa, B.¹; Ramón-Ugalde J.P.^{1*}

¹Instituto Tecnológico de Conkal. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Av. Tecnológico s/n, Conkal, Yucatán, México. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Antigua Carretera Mérida-Motul km 25, Mocochará, Yucatán, México.

*Autor para correspondencia: julio.ramon9@gmail.com

ABSTRACT

Objective: Vitrified ovine embryos produced in two seasons by a "one step" technique, and verify its viability at thawing and its post-transference fertility.

Desing/methodology/approach: Estrus was synchronized in 16 pelibuey ewes, eight per station, by vaginal sponges and superovulated with FSHp. Sponges were removed on 13th day and since his removed, at 56±1 hours females were mated by male, and finally on seventh day the embryos were collected. The collected embryos were selected for "one step" vitrification, submerged for ten minutes in 1.5 M Ethylene Glycol (EG)+0.2 M sucrose in TCM 199; embryos were loaded into straws and immersed in liquid nitrogen. Sixteen straws for each season were thawing. Embryos were evaluated their viability by Hoechst testing vital cell staining, was observed in epifluorescence microscope. The viability, embryo quality and fertility was analyzed by test χ^2 .

Results: There was no differences (P>0.05) between embryo viability 50 and 68.75%, the value of the morphological classification 2.43±0.60 vs. 3.31±0.58 and the percentage of live cells 49.37 vs. 53.75% for spring and autumn, respectively. Study limitations/implications: Fertility per season was 58.3 y 66.6 % (P>0.05) for spring and autumn, respectively.

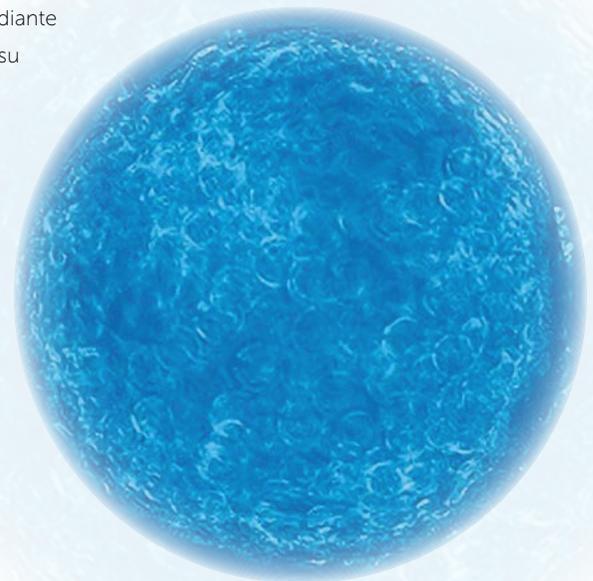
Findings/conclusions: EG as a cryoprotectant is recommended in the use of a "one step" technique, obtaining an average of 59.3% embryo viability, regardless of the reproductive seasonality in superovulated tropical sheep.

Keywords: Embryos, one step vitrification, seasonality.

RESUMEN

Objetivo: Vitrificar embriones ovinos producidos en dos estaciones mediante una técnica "one step", y verificar su viabilidad al descongelado y su fertilidad postransferencia.

Diseño/metodología/aproximación: Se utilizaron 16 ovejas Pelibuey (8 por estación), sincronizadas y superovuladas. Las esponjas se retiraron el día 13 (Día 0). A las 56±1 h del día 0, se dieron montas dirigidas y a los 7 días los embriones fueron colectados. Los embriones fueron vitrificados "one step" (sumergidos 10 minutos en 1.5 M Etilenglicol (EG)+0.2 M sacarosa en TCM 199), colocados en pajuelas e inmersión en nitrógeno líquido. Dieciséis embriones de cada estación desvitrificados fueron teñidos mediante Hoechst y observados en epifluorescencia. Veinticuatro embriones (12 de cada estación) fueron transferidos por endoscopia en ovejas receptoras. La



Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 10, octubre. 2018. pp: 121-126.

Recibido: mayo, 2018. **Aceptado:** agosto, 2018.

tasa de viabilidad, la calidad morfológica y la fertilidad de los embriones se analizó mediante el test χ^2 .

Resultados: La valoración microscópica no mostró diferencias ($P>0.05$) en la viabilidad embrionaria 50 y 68.75 %, calificación morfológica 2.43 ± 0.60 vs. 3.31 ± 0.58 y porcentaje de células vivas 49.37 vs. 53.75 % para primavera y otoño, respectivamente.

Limitaciones del estudio/implicaciones: La fertilidad por estación fue de 58.3 y 66.6 % ($P>0.05$) para primavera y otoño, respectivamente.

Hallazgos/conclusiones: El EG como agente crioprotector es recomendable en el uso de la técnica "one step", logrando una viabilidad embrionaria promedio de un 59.3 % y una fertilidad postransferencia promedio de 54.16 %, independientemente de la estacionalidad reproductiva en ovinos tropicales superovulados.

Palabras clave: Embriones, vitrificación "one step", estacionalidad.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de embriones se ha ido modificando en el tiempo, ya que representa un procedimiento básico en especies domésticas, silvestres y animales de laboratorio (Kasai, 2002). La tecnología más utilizada es la congelación lenta, diseñada para mantener un delicado equilibrio entre el crioprotector (CP) a baja concentración (1-1.5 M) y el compartimento acuoso de los embriones. Por su parte, la vitrificación consiste en una rápida solidificación del líquido con alta concentración de CP (6-7.5 M), evitando la formación de cristales de hielo. En ovinos, la primera criopreservación de embriones exitosa fue con el método de congelación lenta en 1976 (Willadsen *et al.*, 1976), y desde entonces la mayoría de los embriones fueron crioconservados mediante este método hasta 1989, registrando una tasa de supervivencia entre el 30% y el 60% (Willadsen *et al.*, 1976; Tervit y Goold, 1984; Heyman *et al.*, 1987). Desde el momento en que se demostró que la sacarosa podía ser utilizada para retirar el CP de los embriones, Leibo (1984) y Renard *et al.* (1982) diseñaron una técnica de congelación de embriones "one step" utilizando como CP al glicerol (G) 1.4 M, logrando transferir directamente a la receptora sin la necesidad de una evaluación microscópica previa y sin el choque osmótico que sufre cuando se usa el método en etapas. Los porcentajes de preñez que se logran con este método, varían entre 25 y 40 %. En 1989 se reportó el primer éxito de transferencia de embriones ovinos vitrificados (Gajda *et al.*, 1989), y en los últimos años esta técnica ha sido utilizada en embriones tanto *in vivo* como *in vitro*, reportando tasas de supervivencia que van desde el 50 al 80 % (Dattena *et al.*, 2000; Baril *et al.*, 2001, Papadopoulos *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2009). Se han propuesto diferentes protocolos de vitrificación para criopreservar embriones en varias especies, demostrando que su éxito depende de varios factores como el estadio de desarrollo embrionario, origen de los embriones (*in vivo* o *in vitro*) y medio CP (Leoni *et al.*, 2002). En este sentido, el uso del glicerol como agente CP y su remoción en etapas de rehidratación después de la descongelación, disminuye el nivel de eficiencia (Celestinos y Gatica, 2002); por tanto, una técnica que permita la rehidratación dentro del ambiente uterino, haciendo posible la transferencia directa de los embriones luego de ser descongelados, sin necesidad de una manipulación extra y utilizando como agente CP el etilenglicol (EG), sería por

demás conveniente. Por otra parte, hay evidencias de que aun cuando en ovinos tropicales superovulados no se presenta estacionalidad reproductiva, si se observa un efecto estacional detrimental con una mayor atresia folicular en primavera respecto al otoño (Juárez *et al.*, datos sin publicar). El objetivo del presente trabajo fue vitrificar embriones ovinos producidos en dos estaciones mediante una técnica "one step".

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en primavera y otoño 2015, en el Centro de Selección y Reproducción Ovina (CeSyRO) del Instituto Tecnológico de Conkal, ubicado en el km 16.5 de la carretera Mérida-Motul, México, a 21° 02' longitud Norte y 89° 29' longitud Oeste, con clima tropical subhúmedo Aw₀, temperatura media anual de 26.5 °C, precipitación total de 900 mm, a 9 m de altitud (García, 1981).

Animales y sincronización de estros. El estímulo superovulatorio se realizó en 16 ovejas Pelibuey, múltiples y secas. Ocho en una época no reproductiva (primavera) y ocho en una reproductiva (otoño), con peso vivo y condición corporal promedio de 42.5 ± 1.2 kg y 3+, respectivamente; bajo condiciones de pastoreo (pasto estrella, *Cynodon nlemfuensis*), 6 h día⁻¹, complementado con 300 g cabeza⁻¹ día⁻¹ de un concentrado comercial con 14 % proteína cruda. Todas las ovejas fueron inducidas y sincronizadas al estro, durante 13 días (día 0=inserción de esponja), mediante esponjas vaginales (Chronogest[®], Intervet) impregnadas con 20 mg de acetato de fluorogestona (FGA) micronizada, y una dosis de 10 mg de prostaglandina (PGF2 α ; Dynoprost, trometamina: Lutalyse[®], Pfizer)

mL⁻¹, administrada intramuscular (IM) por la mañana del día 6. La superovulación se indujo con 220 UI de hormona folículo estimulante porcina (FSHp; Foltropin-V[®], Bioniche) 10 mL⁻¹ inyectada por vía IM cada 12 horas en ocho dosis decrecientes IM (2, 2, 1.5, 1.5, 1, 1, 0.5, 0.5 mL), durante los cuatro últimos días del tratamiento progestativo. Las esponjas vaginales fueron retiradas el día 13 de haber iniciado el tratamiento coincidiendo con la séptima inyección de FSHp, posteriormente a partir de las 20 horas de la retirada de las esponjas se detectó el inicio del estro mediante machos enteros, a las 36 horas de la retirada de las esponjas todas las ovejas recibieron una dosis IM de 100 µg de Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH; Fertagyl[®], Intervet), finalmente a las 56±1 horas de la retirada de las esponjas se dieron montas dirigidas con machos de fertilidad probada.

Colecta de embriones. En ambas estaciones los embriones fueron colectados a través de la perfusión del útero a los 7 días de la retirada de las esponjas, mediante la técnica descrita por Ramón et al. (2008). Los embriones recuperados fueron clasificados en función de su grado de desarrollo y morfología (Wintenberg-Torres y Sevellec, 1987), solo los embriones morfológicamente normales, de calidad uno y dos, fueron seleccionados para la criopreservación (mórula, mórula compacta y blastocisto).

Procedimiento de vitrificación y desvitrificación "one step". Los embriones recuperados de ambas estaciones fueron lavados en una solución de fosfato buffer salino (PBS; VIGRO Complete Flush sol.) con 10 % de suero fetal bovino (SFB; Sigma-Aldrich F6178) y para la vitrificación fueron sumergidos durante 10 minutos en una solución 1.5 M de EG (JT Baker[®] 9300-01)+0.2 M sacarosa (Sigma-Aldrich[®] S0389) en TCM 199 (Sigma-Aldrich[®] M4530). Los embriones fueron aspirados en pajillas plásticas de 0.25 mL y colocados en columnas como sigue (Figura 1): a) PBS con 10 % de SFB, b) burbuja de aire, c) solución de vitrificación, d) burbuja de aire, e) embrión en solución de vitrificación, f) burbuja de aire y g) solución de vitrificación.

Las pajillas fueron selladas inmediatamente y se colocaron durante diez minutos en vapores de nitrógeno líquido a -6 °C, posteriormente se tocó la columna "c" con una pinza hemostática previamente sumergida en nitrógeno líquido para inducir el "seeding" e inmediatamente las pajuelas fueron inmersas en nitrógeno líquido. Para la desvitrificación, se tomaron 16 pajillas de cada estación (primavera y otoño) y se descongelaron en baño maría a 35 °C durante 1 minuto, para a su vez proceder a expeler su contenido.

Evaluación embrionaria. Los embriones fueron considerados como viables cuando no presentaron signos de degeneración celular como ausencia de simetría, tamaño celular irregular, blastómeros excluidos, incremento de la granulación, células vacuoladas y zona pelúcida (ZP) dañada. Además de la evaluación morfológica, se realizó una tinción vital con Hoechst 33342 (Sigma B2261) para valorar su condición celular. La tinción consistió en realizar un doble lavado en gotas de PBS, un minuto por cada gota, se tomó el embrión en 10 µL del medio de lavado y se colocó en un portaobjetos. Se retiró el exceso de medio y se adicionaron 10 µL de solución Hoechst (10 µg mL⁻¹) por un minuto y se retiró, posteriormente se adicionaron nuevamente 10 µL de medio de lavado a través de un suave pipeteo y se retiró. Por último, se observó al microscopio de epifluorescencia empleando un filtro con capacidad de leer la intensidad del fluorocromo (López et al., 2014).

Análisis estadístico. La tasa de viabilidad, la calidad morfológica y la fertilidad de los embriones se analizó mediante la prueba χ^2 del paquete estadístico Statistix 9.0 (2008). Con fines estadísticos, en los embriones se aplicó un valor a la calificación morfológica de acuerdo con su calidad (Cuadro 1). Así mismo, la valoración del porcentaje de células vivas se realizó asignando los rangos siguientes: 0-25 %, 26 a 50%, 51 a 75 % y 76 a 100 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La viabilidad promedio de los embriones en este experimento fue de 59.3 %, no observándose diferencias entre primavera (50 %) y otoño (68.75 %) (Figura 2).



Figura 1. Distribución de las columnas en la pajilla previa a vitrificación.

Cuadro 1. Calificación morfológica del embrión según su calidad embrionaria (Garbayo *et al.*, 1993).

Calidad del embrión	Calificación morfológica
DG=Degenerado	0
R- =Zona pelúcida abierta	1
R=Grado 3	2
R+ =Grado 2-3	3
B- =Grado 2	4
B=Grado 1	5

El Cuadro 2 muestra la valoración y la calificación morfológica obtenida de los embriones recuperados en primavera y otoño, también se aprecia el valor final obtenido, así como su significancia estadística. Se puede observar un valor promedio de la calificación morfológica de 2.43 y 3.31, para las estaciones primavera y otoño, respectivamente, sin que se aprecien diferencias.

En el Cuadro 3 se presentan los resultados del porcentaje de células vivas tras la tinción, en él se pueden observar valores medios de 49.37 y 53.75 % para primavera y otoño, respectivamente.

Asimismo, en el Cuadro 4 se presentan los resultados de la evaluación de los embriones vitrificados mediante una técnica "one step" que se transfirieron por endoscopia directamente.

La viabilidad embrionaria promedio en este estudio fue de 59.3 % (50 % en primavera y 68.75 % en otoño) se encuentra dentro del intervalo 50 a80 % reportado por Dattena *et al.* (2000), Baril *et al.* (2001), Papadopoulos *et al.* (2002) y Green *et al.* (2009), con un método de vitrificación-desvitrificación en etapas. Por el contrario, resulta superior a los obtenidos por Leibo (1984) con 25.9 %, Chupin *et al.* (1984) con 41.4 % y Cabodevila *et al.* (1992) con 25 % mediante el método "one step", utilizando G como agente CP. Asimismo, el EG ha sido utilizado como CP para transferencia directa con resultados del 44.7 al 50.5 % (Dochi *et al.*, 1998; Nibart y Humblot, 1997); sin embargo, al utilizar los primeros (1.8 M EG+0.25 M de sacarosa) y los segundos (1.5 M EG sin sacarosa) protocolos, ambos muestran resultados más bajos que los obtenidos en el presente estudio con 1.5 M EG+0.2 M de sacarosa. Al parecer, concentraciones de EG superiores a 1.5 M resultan en una disminución de la viabilidad del embrión. Experimentos utilizando hasta 5.5 M EG+1.0 M de sacarosa reportan resultados de 13.3 % de viabilidad embrionaria en ovinos (Boggio y Caorsi, 2002), similares a los reportados con ratones utilizando mezclas de EG con G (Ali y Shelton, 1993). La incorporación de sacarosa al protocolo de vitrificación "one step" con EG se fundamenta en que el EG tiene menor peso molecular que el G, resultando más permeable, lo que provoca pequeños cambios de volumen celular (Voelkel y Hu, 1992), donde la sacarosa juega un papel fundamental ya que preserva

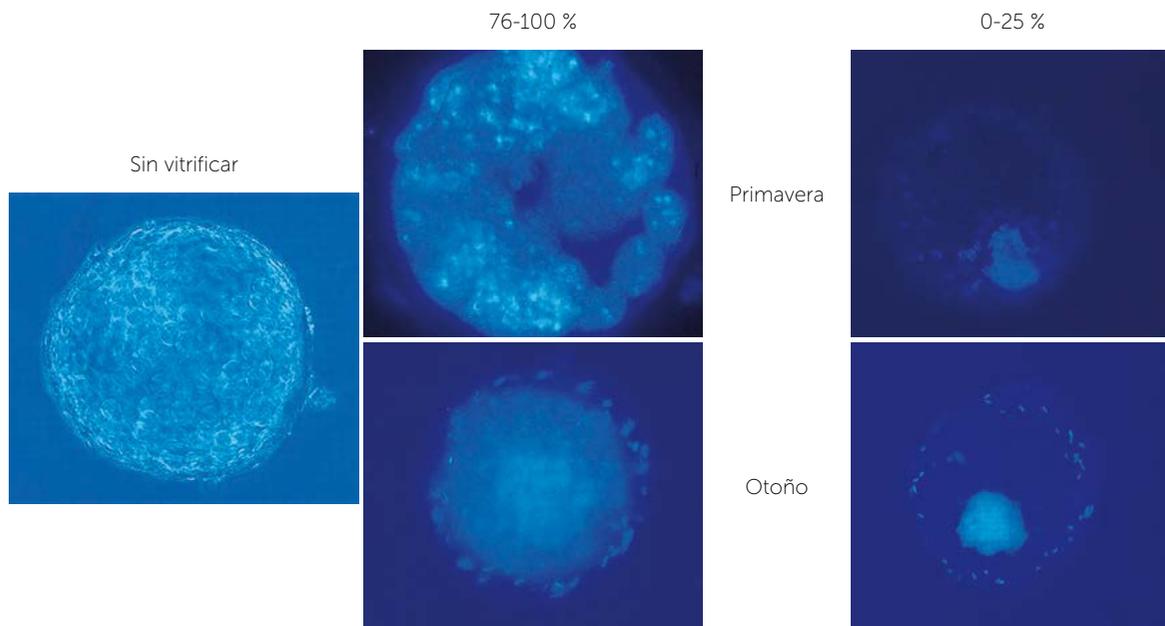


Figura 2. Viabilidad embrionaria (% de células vivas) de cada estación post desvitrificación (tinción vital Hoechst 33342+microscopio de epifluorescencia).

Cuadro 2. Resultados de la calificación morfológica otorgada a los embriones recuperados en ambas estaciones.

Número	Embrión		Calidad embrionaria				Calificación morfológica	
	Estadio		Vitrificación		Desvitrificación			
	P	O	P	O	P	O	P	O
1	M	M	B	B	B	DG	5	0
2	M	M	B	B	B	B	5	5
3	M	MC	B	B	B	B	5	5
4	MC	M	B	B	B	B	5	5
5	M	M	B	B	DG	B	0	5
6	JB	M	B	B	B	DG	5	0
7	M	MC	B	B-	DG	B-	0	4
8	M	M	B	B	DG	B	0	5
9	M	M	B	B	DG	DG	0	0
10	MC	MC	B-	B-	B-	B-	4	4
11	M	M	B	B	DG	DG	0	0
12	M	MC	B-	B	B-	B	4	5
13	M	M	B	B	B	DG	5	0
14	M	M	B	B	DG	B	0	5
15	M	M	B	B	DG	B	0	5
16	M	JB	B	B	R-	B	1	5

Primavera: (39) 2.43±0.60; P>0.05. Otoño: (53) 3.31±0.58; P>0.05.

P: Primavera, O: Otoño, M: mórula, MC: mórula compacta, JB: joven blastocisto, B: embrión de grado 1, B- embrión de grado 2, DG: embrión degenerado, R-: ZP abierta.

la integridad estructural y funcional de las membranas (Guignot *et al.*, 2006). Por otra parte, el resultado de viabilidad embrionaria obtenido en el presente estudio (59.3 % promedio) es aceptable debido en gran parte al estadio morfológico del embrión empleado, ya que es conocido que las mórulas [65 %: Baril *et al.* (2001); 64 %: Green *et al.* (2009)], son mejores que los blastocistos [58 %: Baril *et al.* (2001)] bajo un protocolo de vitrificación "one step". Por el contrario, bajo un protocolo de vitrificación/desvitrificación en etapas es mejor el estadio de blastocisto, donde Gibbons *et al.* (2011) reportan una viabilidad embrionaria de 41.2 y 50 % para mórula y blastocisto, respectivamente.

La viabilidad embrionaria promedio (51.5 %) medida a través de la tinción vital de los embriones vitrificados en dos estaciones dio como resultado un 49.3 % para primavera y 53.7 % para otoño. Las tinciones vitales son útiles para identificar las células vivas a través de fluorescencia, tanto de ovocitos (Báez *et al.*, 2009) como embriones en distintas etapas de desarrollo (Rodríguez-Suástegui, 2012).

Si bien existe discrepancia entre si los ovinos tropicales son o no estacionales (Chemineau, 1993), es posible que de serlo, la viabilidad embrionaria y su calidad podría verse afectada, en este sentido, Juárez *et al.* (datos sin publicar) realizaron un estudio preliminar sobre atresia folicular en ovejas superovuladas en primavera y otoño, encontrando que hay mayor atresia en primavera (53.23 %) respecto al otoño (5.43 %), sin embargo, en el presente estudio no se evidenció un efecto detrimental en la viabilidad embrionaria y porcentaje de células vivas, probablemente este resultado en ambos

Cuadro 3. Resultados de la calificación vital otorgada a los embriones recuperados en ambas estaciones, utilizando la tinción de Hoechst.

Número	Embrión				% Células vivas	
	Estadio		Calidad al desvitrificar			
	P	O	P	O	P	O
1	M	M	B	DG	100	10
2	M	M	B	B	85	75
3	M	MC	B	B	90	85
4	MC	M	B	B	85	80
5	M	M	DG	B	10	50
6	JB	M	B	DG	90	15
7	M	MC	DG	B-	10	50
8	M	M	DG	B	25	75
9	M	M	DG	DG	25	15
10	MC	MC	B-	B-	75	50
11	M	M	DG	DG	10	15
12	M	MC	B-	B	50	80
13	M	M	B	DG	75	15
14	M	M	DG	B	40	60
15	M	M	DG	B	20	90
16	M	JB	R-	B	0	95
Total					49.37*	53.75*

*(P>0.05).

P: Primavera, O: Otoño, M: mórula, MC: mórula compacta, JB: joven blastocisto; B: embrión de grado 1, B- embrión de grado 2, DG: embrión degenerado, R-: ZP abierta.

Cuadro 4. Fertilidad de embriones vitrificados mediante una técnica "one step" transferidos directamente por endoscopia.

Estación	Ovejas transferidas	Ovejas gestantes (%)
Primavera	12	7 (58.3)*
Otoño	12	8 (66.6)*

*(P>0.05).

trabajos está condicionado a que bajo una estrategia de estímulo superovulatorio se elimina la estacionalidad.

CONCLUSIÓN

El EG como agente CP es recomendable en el uso de la técnica "one step", logrando una viabilidad embrionaria promedio de un 59.3 %, independientemente de la estacionalidad reproductiva en ovinos tropicales superovulados.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto CONACYT Ciencia Básica 164592.

LITERATURA CITADA

- Ali J., Shelton J. 1993. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 98: 459-465.
- Báez Contreras J., Pirela Pirela A., Landinez J., Villamedina-Monreal P. 2009. Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad de ovocitos bovinos madurados *in vitro*. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 43: 197-210.
- Baril G., Traldi A., Cognie Y., Leboeuf B., Beckers, J., Mermillod P. 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology* 56: 299-305.
- Boggio J., Caorsi C. 2002. Survival of ovine embryos vitrified in 5.5 M ethyleneglycol + 1.0 M sucrose or 1.0 M trehalose: First report in Uruguay. *Theriogenology* 57: 462.
- Cabodevila J., Alberio R., Palma G., Iovannitti B., Torquati S. 1991. Desarrollo "in vitro" e "in vivo" de embriones bovinos congelados utilizando un método standard simplificado. *Revista Argentina de Producción Animal* 12: 301-312.
- Celestinos M., Gatica R. 2002. Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. Vitrificación como técnica de crioconservación de embriones bovinos. *Archivos de Medicina Veterinaria* 34: 157-165.
- Chemineau P. 1993. Medio ambiente y reproducción animal. *Revista Mundial de Zootecnia* 77: 14-42.
- Chupin D., Florin B., Procureur R. 1984. Comparison of two methods for one step in-straw thawing and direct transfer of cattle blastocysts. *Theriogenology* 21: 455-459.
- Dattena M., Ptak G., Loi P., Cappa P. 2000. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology* 53: 1511-1519.
- Dochi O., Yamamoto Y., Saga H., Yoshiba N., Kano N., Maeda J.S. I. 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: 1051-1058.
- Gajda B., Smorag Z., Wierzbowski S., Jura J., Wieczorek B. 1989. Transfer of Vitrified Sheep Morula. *Reproduction in Domestic Animals* 24: 97-100.
- Garbayo A., Alabart J., Folch J., Cocero M., Ramón J., Fernández-Arias A. 1993. Efecto de la inmunización pasiva contra andrógenos en ovejas "Rasa Aragonesa" superovuladas con FSH. *ITEA, Extra* 12, Tomo 2, pp. 418-420.
- García E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (4ª edición ed.). México, D. F.: FOCET Larios, S. A.
- Gibbons, A., Cueto, M., Pereyra Bonnet, F. 2011. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. *Small Ruminant Research* 95: 61-64.
- Green R., Santos B., Sichele C., Landi S. 2009. Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. *Reproduction in Domestic Animals* 44: 406-410.
- Guignot F., Bouttier A., Baril G., Salvetti P., Pignon P., Beckers J., Mermillod, P. 2006. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology* 66: 1004-1011.
- Heyman Y., Vincent C., Garnier V., Congnié Y. 1987. Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. *The Veterinary Record* 120: 83-85.
- Juárez A., Domínguez Á., Pinzón L., Aguilar E., Ortiz B. y Ramón J. (s.f.). Estacionalidad reproductiva en ovejas tropicales superovuladas. Sin publicar.
- Kasai M. 2002. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reproductive Medicine and Biology* 1: 1-9.
- Leibo S. 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21: 767-790.
- Leoni G., Berlinguer F., Rosati I., Bogliolo L. 2002. Resumption of metabolic activity of vitrified/warmed ovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 64: 207-213.
- López Cardona Á., Tarazona Morales A., Giraldo Echeverri C., Mesa Pineda C., Cadavid Betancur D., Echeverry Berrío D., Ruiz Cortés Z. 2014. Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos: Libro de procedimientos (Primera ed.). Medellín: Fondo Editorial Biogénesis.
- Nibart M., Humblot P. 1997. Le tranfer direct des embryons bovine congelés. *M Elev Et Insem* 2: 3-11.
- Papadopoulos S., Rizos D., Duffy P., Wade M., Quinn K. 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Animal Reproduction Science* 74: 35-44.
- Ramón Ugalde J. P., Folch J., Cocero M., Piña-Aguilar R. 2008. Embryo recovery from the oviduct in superovulated ewes: a method to improve MOET systems. *The Czech Academy of Agricultural Sciences* 53: 141-151.
- Renard J., Heymany Y., Ozil J. 1982. Congélation de l'embryon bovin: Une nouvelle méthode de décongelation pour le transfert cervical des embryons conditionnés une seule fois en paillettes. *Annales de Medecine Veterinaire* 126: 23-32.
- Rodríguez-Suástegui J. 2012. Evaluación del desarrollo embrionario *in vitro* en ovino utilizando medio de cultivo permanente o secuencial. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Statistix 9.0. 2008. Analytical Software. Borland International USA. <http://www.statistica.com/>
- Tervit H., Goold P. 1984. Deep freezing sheep embryos. *Theriogenology* 21: 268.
- Voelkel, S., Hu Y. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 37: 687-697.
- Willadsen S., Polge C., Rowson L., Moor R. 1976. Deep freezing of sheep embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 46: 151-154.
- Wintenberg-Torres S., Sevellec C. 1987. Atlas du développement embryonnaire precocechez les ovins. INRA Station de Physiologie Animale. Jouy en Josas. Publ. Versailles. 51 p.