

# Capítulo LX

## Criopreservación ovocitaria

Francisco J. Báez Contreras, Lic Biol  
Patricia C. Villamediana M, Dra

---

### INTRODUCCIÓN

El objetivo esencial de la criobiología es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular considerándose la supervivencia a la congelación como el producto de numerosos efectos que interaccionan entre sí (Vila, 1984). Al conservar células a temperaturas extremadamente bajas ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) es posible detener por completo la actividad enzimática, la respiración celular, el metabolismo, el crecimiento, la multiplicación, etc. Es decir, se puede mantener las células durante un largo periodo de tiempo sin afectar su viabilidad (Schneider y Mazur, 1984). No obstante, la mayoría de las células mamíferas mueren cuando se exponen a bajas temperaturas, a menos que previamente hayan sido expuestas a una solución que las proteja y a rangos de enfriamiento y calentamiento específicos (Shaw *et al.*, 2000).

La criopreservación de material biológico tiene lugar usualmente en soluciones acuosas, con diferentes solutos presentes. Según Macfarlane (1987) cuando los líquidos de una solución acuosa son sometidos a la congelación, uno de sus componentes presenta la formación de una fase cristalina, mientras que el resto permanece en forma sólida con apariencia de vidrio, sin la formación de cristales de hielo.

En soluciones acuosas algunos líquidos moleculares como el etilenglicol (EG), la formación de vidrio es usualmente observada a concentraciones superiores a 40% p/p. Estos son compuestos en los cuales el punto de congelación de la solución ha sido disminuido lo suficiente (MacFarlane, 1987). Cuando el crioprotector EG alcanza una cierta concentración a bajas temperaturas, la viscosidad es suficientemente alta para impedir la cristalización (Rall, 1987). La formación de hielo aparece solamente cuando las concentraciones de los compuestos que conforman la solución son bajas (MacFarlane, 1987) o cuando son sometidas a temperaturas de congelación que oscilan alrededor de  $-150^{\circ}\text{C}$  como sucede con el EG (Bronshiteyn y Steponkus, 1995).

Los efectos de las bajas temperaturas y la formación de hielo en los sistemas biológicos son los aspectos de mayor importancia para la supervivencia de los organis-

mos que son sometidos a la criopreservación. El principal factor biofísico de destrucción durante el proceso de criopreservación es la formación de hielo intracelular que puede ser evitado por una adecuada deshidratación de la célula (Fabbri *et al.*, 2000).

Según Fabbri (2000), otros de los sucesos críticos en los procesos de criopreservación es la descongelación. El problema que puede surgir durante este proceso es la recrystalización con la formación de hielo intracelular, que puede reducir la sobrevivencia de los ovocitos congelados. Bajo estas circunstancias, la formación de hielo intracelular es más probable que ocurra si la descongelación es lenta, puesto que permite la formación de cristales de hielo a medida que aumenta el daño al ovocito.

## TÉCNICAS DE CRIOPRESERVACIÓN

El procedimiento de la criopreservación involucra una exposición inicial de las células a los agentes crioprotectores, congelación a bajas temperaturas, almacenamiento, descongelación y finalmente la dilución y remoción de los agentes crioprotectores, volviendo a un ambiente fisiológico que le permita el desarrollo a la célula criopreservada. Durante la congelación, las células cambian su volumen debido a las diferentes presiones osmóticas existentes entre las soluciones intracelulares y extracelulares. Estos cambios en el volumen celular afectan varios parámetros de importancia para la sobrevivencia del ovocito, incluyendo la integridad de la membrana plasmática y de sus organelas (Agca, 2000).

Los métodos de criopreservación se han clasificado en: congelación lenta convencional (Rall, 1992), congelación lenta-descongelación rápida, congelación ultrarrápida y vitrificación. En los protocolos de congelación lenta, la adición del crioprotector suele hacerse por pasos y el descenso de la temperatura se realiza lentamente. El objetivo principal de este tipo de criopreservación es el de controlar la velocidad de enfriamiento de tal forma que a medida que descienda la temperatura se produzca la penetración del crioprotector al interior de la célula produciéndose un equilibrio osmótico y disminuyendo la probabilidad de formación de hielo intracelular; la tasa de enfriamiento para esta técnica es de 0,2 a 0,3°C/minuto (Albarracín, 2005). La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso del congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace a temperatura ambiente o en un baño de agua a 37°C, para evitar la recrystalización (Martino *et al.*, 1995).

En el caso de los protocolos de congelación rápida se utilizan soluciones con altas concentraciones de solutos (crioprotectores y azúcares). En esas soluciones las células están lo suficientemente deshidratadas y permeables a los agentes crioprotectores tolerando la inmersión directa dentro del nitrógeno líquido o en los vapores de nitrógeno. Un número de soluciones son formuladas para que solidifiquen sin la formación de cristales de hielo. Esas son las llamadas “soluciones vitrificadoras” (Shaw *et al.*, 2000).

Los protocolos de congelación rápida se dividen en dos subcategorías dependiendo de si existe (congelación rápida o ultrarrápida) o no (vitrificación) formación de hielo en la solución durante la congelación. Si bien la diferenciación entre congelación ultrarrápida y vitrificación no está bien establecida, se debería utilizar el término vitrificación solo para aquellas técnicas en las que no se forman cristales de hielo ni

intracelular ni extracelular durante la congelación y descongelación. Por el contrario, si se forman aunque sólo sean trazas de hielo durante estos procesos, el término correcto debería ser congelación ultrarrápida (Shaw *et al.*, 2000).

Este método se basa en la congelación rápida en una mezcla de crioprotectores utilizados a muy altas concentraciones, que a bajas temperaturas aumentan su viscosidad formando un vidrio, sin formación de hielo. La vitrificación presenta numerosas ventajas como la total eliminación de la formación de hielo o la disminución del daño causado por el enfriamiento, puesto que atraviesa el rango de temperatura de +15 a -15°C, considerada la zona de letalidad, a velocidades de enfriamiento muy rápidas (Martino *et al.*, 1996; Isachenko *et al.*, 1998).

La consecuencia negativa de esta estrategia radica en el incremento de las probabilidades de lesionar las células debido al choque osmótico y a la toxicidad de los crioprotectores. Sin embargo, se han aplicado diferentes protocolos para intentar disminuir estos efectos negativos, como el uso de crioprotectores menos tóxicos o la combinación de crioprotectores, la utilización de soluciones preenfriadas (Vajta, 2000) y la utilización de crioprotectores por etapas (Otoi *et al.*, 1995; Mtango *et al.*, 2001).

Las diferentes técnicas de vitrificación utilizan una gran variedad de soportes para minimizar el volumen a vitrificar, entre estas se pueden mencionar a las pajuelas abiertas estiradas (del Inglés: *open pulled straws*, OPS) (Otoi *et al.*, 1995; Hurtt *et al.*, 2000; Men *et al.* 2003; Diez *et al.*, 2005; Albarracín *et al.*, 2005; Mucci *et al.*, 2006); las pajuelas cerradas estiradas (del Inglés: *closed pulled straws*, CPS) (Chen *et al.*, 2001); los crioviales (Nedambale *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2004); micropipetas de vidrio estiradas a mano (del Inglés: *glass micropipette*, GMP) (Cho *et al.*, 2002, Vieira *et al.*, 2006); la malla de nylon (Matsumoto *et al.*, 2001); *cryoloop* (Mavrides y Morroll, 2002; Mavrides y Morroll, 2005); rejillas de cobre para microscopía electrónica (Martino *et al.*, 1996) y más reciente, la vitrificación en microgotas. Con la técnica de OPS se logra una tasa de enfriamiento de aproximadamente 20000°C/minuto (Vajta, 2000). La vitrificación con la técnica de OPS ha demostrado ser una de las más eficientes para la criopreservación de ovocitos bovinos (Albarracín *et al.*, 2005a; Men *et al.*, 2002; Vajta *et al.*, 1998, citado por Albarracín) obtuvieron 2,5, 8,37% y 25% de tasa de formación de blastocistos, respectivamente.

## **ALTERACIONES CAUSADAS POR LA CRIOPRESERVACIÓN**

Uno de los retos más grandes para los criobiólogos ha sido desarrollar métodos de criopreservación eficientes para ovocitos de animales domésticos y humanos. Es conocido que los ovocitos son particularmente difíciles de criopreservar debido a la sensibilidad de la ultraestructura del ovocito a los cambios de temperatura y de presión osmótica extracelular durante la congelación y descongelación, lo cual ocasiona una desorganización del citoesqueleto, anomalías cromosómicas, desintegración del huso, exocitosis prematura de los gránulos corticales, endurecimiento de la zona pelúcida y desintegración de la membrana plasmática, entre otras (Kazem *et al.*, 1995, citado por Fabbri *et al.*, 2000; Fuku *et al.*, 1995). Fabbri *et al.* (2000) concluyeron que la tasa de sobrevivencia de los ovocitos después de la criopreservación es dependiente de

una combinación de varios factores que incluyen la variabilidad de la morfología del ovocito, factores biofísicos y el procedimiento utilizado para la criopreservación.

Al Hasani *et al.* en 1995 (citado por Fabbri *et al.*, 1998) usando microscopía electrónica, demostraron una reducción en el número de gránulos corticales en ovocitos descongelados de humanos y ratones. En contraste con Gook *et al.* (1993), citado por Fabbri (2000), quienes estudiando la criopreservación de ovocitos de ratones y de humanos usando 1,2-propanodiol y su efecto sobre la configuración del huso meiotico, encontraron una abundancia de gránulos corticales en el citoplasma.

A pesar de todos estos cambios que ocurren a nivel celular y nuclear, Van Blerkom y Davis (1994) estudiaron las consecuencias citogenéticas, celulares y en el desarrollo debido a la criopreservación en ovocitos de ratones y humanos madurados e inmaduros, demostraron que en ovocitos de ratones inmaduros la estructura y organización citoplasmática son progresivamente restauradas después de la descongelación, reanudándose una meiosis normal. Muchos de esos ovocitos son capaces de desarrollarse hasta blastocistos, a diferencia de los ovocitos humanos congelados en metafase II quienes detienen su desarrollo durante el estadio temprano de la división, exhibiendo un patrón anormal de citoquinesis.

**Cuadro 1**  
**Factores asociados con la criopreservación que contribuyen al daño y muerte celular en los sistemas biológicos**

Sistema	Tipo / Causa del Daño
Todo	Formación de hielo intracelular y extracelular, apoptosis, toxicidad, metabolismo general.
Membrana	Ruptura
Cromosomas	Pérdida/ganancia, poliespermia, falla para la extrusión del cuerpo polar.
DNA	Apoptosis
Citoesqueleto	Microtúbulos disueltos.
Proteínas/enzimas	Deshidratación, pérdida de sus funciones
Ultraestructura	Gránulos corticales, zona pelúcida
Zona pelúcida	Endurecimiento, fracturas

Fuente: Shaw *et al.*, 2000.

Se ha demostrado que la exposición de ovocitos en metafase II a crioprotectores o a bajas temperaturas (Pickering *et al.*, 1990), puede causar la despolimerización de los microtúbulos que conforman el huso meiótico con la consecuente dispersión de cromosomas y el riesgo de aneuploidías en el embrión resultante (Kola *et al.*, 1988; citado por Boiso y Martí, 1997). Además un aumento en la frecuencia de no extrusión del segundo corpúsculo polar después de la criopreservación, podría dar lugar a embriones poliploides (Carroll, *et al.*, 1989; citado por Boiso y Martí, 1997). El origen de las anomalías cromosómicas y de una citoquinesis anormal luego de la criopreservación sería la disrupción de la estructura del citoesqueleto (Fabbri *et al.*, 2000). Diversos estudios utilizando ovocitos en metafase II han demostrado que la tasa de supervivencia del ovocito después de la criopreservación podría ser afectada por factores

morfológicos y fisiológicos. Entre los más importantes se encuentra las características del ovocito tal como la madurez, la calidad y el tamaño.

## **CRIOPRESERVACIÓN EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

En las últimas décadas se han realizado considerables esfuerzos en poner a punto los procedimientos de maduración (De Wit, 2001), fecundación (Sagirkaya, 2006) y cultivo (MIV-FIV-CIV) para la producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos (Pereira *et al.*, 2005). La aplicación a gran escala de estas biotecnologías reproductivas puede representar una mejora notable de los recursos genéticos al permitir obtener animales con mejores características de importancia económica en respuesta al problema de la disponibilidad de alimentos, la conservación y salvaguarda de especies en peligro de extinción. A su vez esto permitiría aprovechar y hacer uso de los animales élite mediante la conservación de gametos. El desarrollo e implementación de los programas de PIV de embriones, el clonaje y la transgenia han estimulado significativamente la estandarización de protocolos para la criopreservación de gametos en especial la de ovocitos mamíferos (Shaw *et al.*, 2000) para el establecimiento y mantenimiento de bancos de germoplasmas (Vieira *et al.*, 2002).

Existe un gran interés, en la posibilidad de obtener blastocistos a partir de ovocitos criopreservados, convirtiéndose esta en una prioridad que a su vez hace posible la evaluación y diseño de protocolos de criopreservación cada vez más eficientes (Massip, 2003; Agca, 2000). Las tasas de supervivencia de los ovocitos tras la congelación son relativamente bajas. Los ovocitos que sobreviven presentan bajas tasas de fecundación y su capacidad de desarrollo, medida como el número de embriones viables en relación al número de ovocitos congelados, se mantiene baja comparada con la obtenida a partir de ovocitos frescos (Albarracín *et al.*, 2005). Estos resultados no se limitan a la técnica de criopreservación *per se*, sino también a las condiciones o pasos previos a esta, como lo son el origen, estadio de desarrollo y el sistema de maduración de los ovocitos, los cuales pueden afectar su desempeño.

Con el propósito de superar los efectos adversos de los diversos pasos involucrados en los protocolos de congelación-descongelación sobre la estructura del ovocito, cuyas consecuencias directas son las alteraciones del huso meiótico y la placa metafásica (Rodríguez, 2001) y las bajas tasas de fecundación, se ha planteado la vitrificación como uno de los métodos más prometedores para solucionar los problemas que conlleva el criopreservar este tipo de célula (Massip, 2003).

La vitrificación ha permitido aumentar la velocidad de los cambios de temperatura, lo que ofrece ciertas ventajas para la congelación, como lo son la disminución de la concentración de los crioprotectores y además el paso más rápido por la zona de temperatura crítica, lo que produce menos daños por enfriamiento (Silva y Berland, 2004). Sin embargo, los ovocitos mamíferos siguen siendo una de las células más difíciles de criopreservar (Diez *et al.*, 2005). En la actualidad, se han vitrificado ovocitos de varias especies animales: rata (Chen *et al.*, 2004), cerda (Men *et al.*, 2005), búfalo (Wani *et al.* 2004), yegua (MacLellan *et al.*, 2002; Tharasanit *et al.*, 2006), cabra (Beging *et al.*, 2003), oveja (Al-aghbari, 2002; Dattena *et al.*, 2004), vaca (Otoi *et al.*, 1995; Matsumoto *et al.*, 2001; Mavrides y Morrol, 2002; Men *et al.*, 2002; Rodríguez, 2003; Diez

*et al.*, 2005; Albarracín *et al.*, 2005; Mavrides y Morral, 2005; Vieira *et al.*, 2006) y humano (Boiso, 2001; Tan, 2004; Chen *et al.*, 2004).

Estudios previos en nuestro laboratorio, con ovocitos bovinos inmaduros y madurados *in vitro* vitrificados en presencia o no de células del cumulus, recomiendan la criopreservación de ovocitos madurados *in vitro* en presencia de las células del cumulus, proponiéndose un estudio inmunocitoquímico, para una mejor evaluación de los efectos de vitrificación y de los agentes crioprotectores sobre la estructura del huso meiótico y los cromosomas en ovocitos bovinos frescos y criopreservados inmaduros y madurados *in vitro*. El estudio inmunocitoquímico corroboró que el estadio meiótico en que se encuentran los ovocitos al momento de la vitrificación influye sobre la capacidad de estos de resistir el proceso de criopreservación, siendo el estadio de VG más sensible al efecto tóxico de los crioprotectores a temperatura ambiente y al proceso de criopreservación como tal.

El protocolo de vitrificación utilizado en este estudio resultó ser más beneficioso para los ovocitos bovinos madurados *in vitro*. Se demuestra que la vitrificación tiene efecto deletéreo sobre la estructura del huso meiótico de ovocitos bovinos congelados, siendo la anomalía mayormente observada la ausencia de huso meiótico. La estructura del huso meiótico de ovocitos bovinos madurados *in vitro* resultó ser más resistente al daño crioinducido. En la actualidad se llevan a cabo estudios para evaluar la capacidad de desarrollo de los ovocitos criopreservados luego de la fecundación *in vitro* hasta el estadio de blastocistos.

## CONCLUSIONES

A pesar del progreso significativo en la criopreservación de ovocitos y embriones mamíferos, muchos de los eventos moleculares y bioquímicos en los que se basan estas tecnologías no están del todo entendidos. En años recientes, las investigaciones se centran en la obtención de ovocitos viables, competentes para el desarrollo. Aún en las condiciones más favorables, se han obtenido solo éxitos limitados cuando se compara con ovocitos frescos que son los utilizados de manera rutinaria en la producción de embriones *in vitro*.

Los daños causados por la congelación y los efectos tóxicos de los crioprotectores son las principales consecuencias adversas luego de los crioprocimientos. Se están desarrollando diferentes estrategias para mejorar los resultados de la criopreservación. Estas estrategias incluyen la reducción de los volúmenes de los contenedores, incremento del gradiente térmico, cambios en la relación superficie/volumen, mejoramiento de la criotolerancia mediante la suplementación con varios aditivos o modificando la composición lípido-lípido de la membrana ovocitaria. El desarrollo de nuevas estrategias para reducir de diversas maneras el estrés asociado con la criopreservación es fundamental para lograr una mejor comprensión de los principales cambios responsables de las bajas tasas de sobrevivencia tras la descongelación.

Con estos conocimientos, se espera que el criomacemamiento de ovocitos llegue a ser una técnica reproductiva totalmente confiable en el futuro cercano. Está claro que no hay una necesidad urgente de implementar la congelación de ovocitos entre las tecnologías de reproducción asistida que se utilizan en la actualidad. Siempre está

la poderosa metodología de la congelación de embriones como alternativa confiable. No se trata de transformar la congelación ovocitaria en un sustituto de la congelación de embriones, pero si darle su destino propio. Hay áreas específicas en las que la congelación ovocitaria puede ser válida. En producción animal clásica, los productores pudieran preservar líneas femeninas de alto valor genético, comercializar ovocitos más que embriones en los que el padre ya ha sido escogido. En especies en peligro de extinción es dable conservar el material genético femenino de esos animales vulnerables. En la producción y mantenimiento de líneas de animales transgénicos, cuyas capacidades reproductivas son pobres y más aun tomando en cuenta que la producción de estas líneas es un proceso lento y costoso. Cuando esté completamente optimizada, la criopreservación ovocitaria tendrá múltiples aplicaciones.

## LITERATURA CITADA

- Agca Y. 2000. Cryopreservation of Oocyte and Ovarian Tissue. *Ilar Journal* 41: 207-220.
- Al Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. 1987. Cryopreservation of human oocyte. *Human Reproduction* 2: 695-700.
- Al-aghbari A, Menino A. 2002. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. *Animal Reproduction Science*. 71: 101-110.
- Albarracín J. 2005. Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica de open pulled straw: estudio estructural de cromosomas, microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 127 p.
- Albarracín J, Morató R, Rojas C, Mogas T. 2005. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertad and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 63: 890-901.
- Boiso I. 2001. Efecto de la criopreservación sobre la estructura del uso meiótico de ovocitos humanos madurados *in vitro*. Tesis Doctoral en Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona. 161 p.
- Bronshteyn V, Steponkus P. 1995. Nucleation and Growth of ice Crystals in Concentrated Solutions of Ethylene Glycol. *Cryobiology* 32: 1-22.
- Chen C, Wang C, Tsai W, Hsieh L, Wang H, Soong Y. 2004. Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized night microscopy. *Fert Steril*. 82: 666-672.
- De Wit A, Kruij T. 2001. Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for a-amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Anim Reprod Sci* 65: 51-56.
- Diez C, Duque P, Gómez E, Hidalgo C, Tamargo C, Rodríguez A, Fernández L, De la Vega S, Fernández A, Facal N, Carbajo M. 2005. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology* 64: 317-333.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera M, Seracchhioli R, Ciotti P, Magrini O, Venturoli S, Flamigni C. 1998. Oocyte cryopreservation. *Human Reprod* 4: 98-108.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera M, Rocchetta G, Ciotti P, Magrini O, Saracchhioli N, Venturoli S, Flamigni C. 2000. The technical aspects of Oocyte Cryopreservation. *Mol Cell Endoc* 169: 39- 42.

- Fuku E, Xia L, Downey B. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 32: 139-156.
- Hurt A, Landim-Alvarenga F, Siedel G, Squires E. 2000. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology*. 54: 119-128.
- Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Sanchez 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.
- Liebermann J, Tucker M. 2002. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction* 124: 483-489.
- Macferlane D. 1987. Physical Aspects of Vitrification in Aqueous Solutions. *Cryobiology*. 24:181-195.
- Marin A. 2003. Criopreservación de tejido ovárico y congelación de ovocitos. Centro de Transfusión y Banco de tejidos. Barcelona.
- Martino A, Pollard J, Leibo S. 1996a. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. *Mol Reprod Dev* 45: 503-512.
- Martino A, Songsasen N, Leibo S. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 54: 1059-1069.
- Martino A, Mogas T, Palomo MJ, Paramio M. 1995. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 43: 473-485.
- Massip A. 2003. Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. *Reprod Nutr Dev* 43: 325-330.
- Matsumoto H, Jiang J, Tanaka T, Sasada H, Sato E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 42: 139-144.
- Mavrides A, Morroll D. 2002. Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete?. *Reprod Nutr Dev* 42: 73-80.
- Mavrides A, Morroll D. 2005. Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *Europ J Obst Gynec Reprod Biol* 118: 66-70.
- Men H., Agca Yuksel, Critser E, Critser J. 2005. Beneficial effects of serum supplementation during in vitro production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straws vitrification. *Theriogenology* 64: 1340-1349.
- Men H, Monson R, Parrish J, Rutledge J. 2003. Degeneration of cryopreserved bovine oocyte via apoptosis during subsequent culture. *Cryobiology* 47: 73- 81.
- Men H, Monson R, Rutledge J. 2002. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance. *Theriogenology* 57: 1095-1103.
- Mtango N, Varisanga M, Dong Y, Otoi T, Suzuki T. 2001. The effect of prefreezing the diluent portion of the straw in step-wise vitrification process using ethylene glycol and polyvinylpyrrolidone to preserve bovine blastocysts. *Cryobiology* 42: 135-138.
- Mucci N, Aller J, Kaiser G, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio R. 2006. Effect of strous cow serum during bovine embryos culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65: 1551-1562.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N., Suzuki T. 1995. *In Vitro* Fertilization and Developmental of Immature and Mature Bovine Oocyte Cryopreserved by Ethylene Glycol with Sucrose. *Cryobiology* 32: 455-460.



- Pereira D, Dove M, Rumpf R. 2005. Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 63: 1131-1141.
- Rall W. 1987. Factors Affecting the Survival of Mouse Embryos Cryopreserved by Vitrification. *Cryobiology* 24: 387-402.
- Rall W. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim Reprod Sci* 28: 237-245.
- Rodríguez B. 2003. Estudio Citogenético de Ovocitos Bovinos Criopreservados Madurados *In Vitro*. Trabajo Especial de Grado para optar al Título de Licenciado en Biología. Universidad del Zulia. Venezuela. 78p.
- Rodríguez B, Molina J, Villamediana P. 2004. Sobrevivencia morfológica y progresión meiótica de ovocitos bovinos vitrificados. *Ciencias* 12: 125-136.
- Rodríguez E. 2001. Producción *in vitro* de Embriones Caprinos: Sistemas de Maduración Citoplasmáticas de Ovocitos de Hembras Prepúberes. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 320 p.
- Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First N., Parrish J, Memili E. 2007. Development potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim Reprod Sci* 101, 225-240.
- Schneider U, Mazur P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 21(1): 68-79.
- Shaw J, Oranratnachai A, Trounson A. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53: 59-72.
- Silva M, Berland M. 2004. Vitrificación de blastocitos bovinos producidos *in vitro* con el método de open pulled straw (OPS): primer reporte. *Arch Med Vet XXXVI* (1)
- Tan J. 2004. Vitrification of Human Oocytes and Bovine Oocytes and Embryons. ISEF Judging Committee. Selwyn House School, Westmount, Quebec, Canadá. 10 pp.
- Tharasanit T, Colleoni S, Lazzari G, Colenbrander B, Galli C, Stout T. 2006. Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. *Reproduction*.
- Vajta G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci* 60-61: 357-364.
- Vajta G, Kuwayama M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 65: 236-244.
- Van Blerkom J, Davis P. 1994. Cytogenetic, cellular, and developmental Consequences of Cryopreservation of Inmature and Mature Mouse and Human Oocytes. *Micros Res Tech* 27: 165-193.
- Vieira A, Mezzalira A, Barbieri D, Lehmkuhl R, Rubin M., Vajta G. 2002. Calves born after open pulled straw vitrification of immture bovine oocytes. *Cryobiology* 45: 91-94.
- Vila, L. 1984. Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. *Biol Clinic Hemat* 6: 227-236.
- Wani N, Misra A, Maurya S. 2004. Maturation rates of vitrified-thawed immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of different types of cryoprotectants. *Anim Reprod Sci* 84: 327-335.