

Desarrollo embrionario *in vitro* y tasa de concepción de ovocitos bovinos (*Bos indicus*) vitrificados en estadio maduro

In vitro embryonic development and conception rate of vitrified bovine oocytes (*Bos indicus*) in mature stage

Yander M. Briceño¹, Ilse Silvia Cayo-Colca^{1,2}

RESUMEN

Se evaluó el desarrollo embrionario *in vitro* y la tasa de concepción a partir de ovocitos bovinos (*Bos indicus*) vitrificados en estadio maduro. Los ovarios fueron colectados de vacas Brahman del camal municipal de Bagua Grande, Amazonas, Perú. Los ovarios colectados fueron trasladados al laboratorio en solución NaCl 0.9% con 0.025 mg/ml de estreptomina. Los ovocitos fueron aspirados, madurados *in vitro* y vitrificados. Se determinó el estadio nuclear de los ovocitos con tinción aceto-orceína. El 12.5% exhibió vesícula germinal, el 5% alcanzó metafase I (MI) y el 82.5% alcanzó metafase II (MII) de estadio nuclear. El potencial de desarrollo embrionario fue evaluado al séptimo día de cultivo *in vitro*. Se obtuvo 5.8% de mórulas y 10.4% de blastocistos en el grupo experimental (n=154 ovocitos vitrificados) y 11.6% de mórulas y 24.9% de blastocistos en el grupo control (n=181 ovocitos sin proceso de vitrificación). Finalmente, 14 embriones producto de ovocitos vitrificados fueron transferidos en vacas receptoras, llegando a formar la vesícula embrionaria a los 35 días de la transferencia en tres vacas (21.4%).

Palabras clave: vitrificación, metafase II, cryotop, blastocistos, preñez

ABSTRACT

In vitro embryonic development and conception rate of bovine oocytes (*Bos indicus*) vitrified in mature stage were evaluated. The ovaries were collected from Brahman cows from the Bagua Grande municipal slaughterhouse (Amazonas, Peru). The collected ovaries were transferred to the laboratory in 0.9% NaCl solution with 0.025 mg/ml streptomycin. The oocytes were aspirated, matured *in vitro* and vitrified. The nuclear stage of the

¹ Escuela de Posgrado, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-A), Chachapoyas, Perú

² E-mail: icayo.fizab@untrm.edu.pe

Recibido: 30 de octubre de 2020

Aceptado para publicación: 25 de junio de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

oocytes was determined with aceto-orcein staining. Among them, 12.5% exhibited germinal vesicle, 5% reached metaphase I (MI) and 82.5% reached metaphase II (MII) of nuclear stage. The potential for embryonic development was evaluated on day 7 of the *in vitro* culture. It was obtained 5.8% of morulae and 10.4% blastocysts in the experimental group (n=154 vitrified oocytes) and 11.6% of morulae morulae and 24.9% of blastocysts in the control group (n=181 oocytes without vitrification process). Finally, 14 embryos produced from vitrified oocytes were transferred in recipient cows, reaching the embryonic vesicle 35 days after transfer in three cows (21.4%).

Key words: vitrification, metaphase II, cryotop, blastocysts, pregnancy

INTRODUCCIÓN

En el Perú se viene empleando biotecnologías reproductivas como la superovulación y transferencia embrionaria (SOV-ET), y la criopreservación de embriones producidos *in vivo*; técnicas que han demostrado su gran aporte al mejoramiento genético de la ganadería bovina del país. Así mismo, la producción *in vitro* de embriones y la conservación de gametos por empresas comerciales o centros de investigación, conlleva a la necesidad del uso de tecnologías de criopreservación. Tal es así, que la criopreservación de ovocitos tiene aplicación potencial, no solo para la investigación básica, reproducción asistida, tecnologías comerciales o programas de crianza de animal, sino también para la preservación de la biodiversidad (Chaves *et al.*, 2017). De igual forma, la criopreservación de ovocitos bovinos representa una alternativa para la creación de bancos genéticos y una herramienta necesaria en los programas de mejoramiento genético (Dinnyés *et al.*, 2000).

En la actualidad existen protocolos comerciales en técnicas de criopreservación lenta, rápida y ultra rápida de ovocitos humanos (Braude, 2006). Una de estas tecnologías es la vitrificación, que es considerada como una tecnología ultra rápida, la cual permite congelar ovocitos disminuyendo la formación de cristales de hielo mediante el in-

cremento de la viscosidad y logrando la formación del estado vítreo en el citosol (Pegg, 2002). Así mismo, los protocolos de criopreservación se fundamentan en procesos combinados de deshidratación, depresión del punto de congelación y sobre-enfriamiento en un intento de evitar daño celular. Sin embargo, sus efectos tóxicos por el uso de altas concentraciones de crioprotectores; así como el estrés osmótico por la pérdida de agua, sigue siendo un problema para la viabilidad de estas células (Pugh *et al.*, 2003). De allí la importancia de utilizar combinaciones de crioprotectores de acción interna y externa que permitan reducir los daños a nivel de la membrana, citoesqueleto, ADN, función de proteínas y la zona pelúcida del ovocito (Men *et al.*, 2003). Estos problemas hacen que la criopreservación de ovocitos bovinos siga siendo un reto significativo para la reproducción asistida (Martins, 2004). Ejemplos de crioprotectores usados incluyen al glicerol, dimethyl sulphoxide (DMSO), ethylene glycol (EG) y algunos azúcares como la sacarosa (Pegg, 2002).

Estudios en la técnica de vitrificación de embriones y ovocitos humanos indican que los resultados de éxito se traducen en tasas de gestación y que están influenciadas por el germoplasma criopreservado (Almodin *et al.*, 2010), material usado (Roy *et al.*, 2014; Marco-Jiménez *et al.*, 2016), proceso de descongelamiento, y el sistema de vitrificación empleado (Vajta *et al.*, 2000; Kuwayama *et*

al., 2007), entre otros. Es así, que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un protocolo de vitrificación de ovocitos en estadio maduro sobre la supervivencia, desarrollo embrionario y tasa de gestación de bovinos *Bos indicus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos y medios de cultivo usados proceden de Sigma-Aldrich (USA), salvo indicación expresa de otras fuentes.

Lugar del Estudio

El estudio se desarrolló en la región Amazonas (Perú). Los ovarios se colectaron en el camal de Bagua Grande (440 msnm), Amazonas, Perú, entre agosto de 2017 y enero de 2018. La vitrificación de los ovocitos y la posterior fecundación *in vitro* fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Animal, Reproducción y Mejoramiento Genético de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas en la ciudad de Chachapoyas (2335 msnm). Los embriones producidos *in vitro* se transfirieron en marzo de 2018 a vacas cruzadas, previamente sincronizadas, en el distrito de Quinjalca (3065 msnm), provincia de Chachapoyas.

Material Biológico

Se colectaron ovarios de ganado bovino Brahman en un recipiente isotérmico conteniendo CINA al 0.9% (wt/vol) suplementada con 0.025 mg/ml de estreptomina, temperado a 37 °C. En el laboratorio, los complejos cúmulos ovocitos (COC) se aspiraron de folículos de 2-7 mm de diámetro con una jeringa de 10 ml y una aguja de 18G 1½". Los COC fueron seleccionados usando un estereoscopio (Olympus, Japón) y se utilizaron solo los que presentaron un citoplasma homogéneo y por lo menos dos capas completas de células del *cumulus oophorus* (Liebfried y First, 1979).

Maduración *in vitro*

Un total de 415 COC se maduraron *in vitro* hasta alcanzar la metafase II, en grupos de 20, en gotas cubiertas con aceite mineral durante 22 h a 38.5 °C y 6% de CO₂, con aire saturado de humedad. Las gotas para la maduración estuvieron compuestas de medio de maduración TCM-199 enriquecido con 0.1 mg/ml de L-glutamina, 0.25 mg/ml de piruvato de sodio, 0.01 U/ml de hormona folículo estimulante (FSH), 0.01 U/ml de hormona luteinizante (LH), 1 µg/ml de 17β-estradiol, 50 µg/ml de gentamicina y 10% de suero fetal bovino (SFB).

Luego de las 22 h, se evaluó la estructura nuclear de 80 COC seleccionados al azar, con ayuda de un microscopio binocular (Olympus, Japón), previa fijación de los ovocitos en láminas portaobjeto con solución de ácido acético-etanol (1:3, vol/vol) y teñidos con 1% de aceto-orceína al 1% (wt/vol) (Motlik y Fulka, 1976; Hirao *et al.*, 1995).

Vitrificación y Descongelación de Ovocitos

Luego de las 22 h, los 335 COC restantes, fueron divididos en dos grupos; 181 COC fueron distribuidos al azar para conformar el grupo control (sin vitrificación) y continuar inmediatamente la fecundación y cultivo *in vitro* de los embriones, y 154 COC fueron usados como grupo experimental (para vitrificación). Los COC del grupo experimental fueron sumergidos en una solución de equilibrio (SE) durante 3 min. La SE consistió en 7.5% de etilenoglicol (EG) y 7.5% de dimetilsulfóxido (DMSO) en una solución base (SB). La SB estuvo compuesta por TCM-199 HEPES y 20% de SFB. Posteriormente, los COC fueron expuestos por 1 min a la solución de vitrificación (SV) preparada con 15% de EG, 15% de DMSO y 0.5M de sacarosa en SB. Los COC fueron colocados en cryotops y sumergidos inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados en tanques de nitrógeno líquido (MVE, USA).

Cuadro 1. Estadio nuclear de los Complejos Cúmulos - Ovocitos (COC) a las 22 horas de maduración *in vitro*

Ovocitos n (%)	Estadio nuclear ¹		
	VG n (%)	MI n (%)	MII n (%)
80 (100)	10 (12.5)	4 (5)	66 (82.5)

¹ VG: en estadio de vesícula germinal; MI y MII: ovocito maduro en metafase II o MII

Luego de 20 días de la vitrificación del grupo experimental, se procedió a la descongelación de los COC. Para ello, se sumergió cada cryotop directamente en la solución de descongelamiento (SD) durante 30 segundos a 40 °C (preparada con 1M de sacarosa en la solución base), para luego exponerlos a la solución de dilución (SDi) durante 5 minutos a 40 °C (preparada con 0.5M sacarosa en la solución base). Finalmente, los ovocitos fueron lavados tres veces en SB dejándolos reposar por 3 minutos entre lavados, para luego ser incubados a 38.5 °C y 6% de CO₂ en medio TCM-199 HEPES suplementado con 10% de SFB y 50 µg/ml de gentamicina durante 4 horas para su recuperación.

Fecundación y Cultivo *in vitro*

Los COC, una vez descongelados, fueron colocados en el medio de fecundación, el cual estuvo compuesto por TALP FIV (Vajta *et al.*, 2000) suplementado con 0.044 g/l de piruvato de sodio, 0.03 mg/ml de heparina, 50 µg/ml de gentamicina y 3.0 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA-FAF). Los ovocitos se fecundaron *in vitro* con espermatozoides (10⁶/ml) de toros Angus seleccionados y capacitados con la técnica de gradientes de Percoll (Parrish *et al.*, 1995), para finalmente ser incubados por 18 horas a 38.5 °C y 6% de CO₂.

Los presuntos cigotos se cultivaron en gotas cubiertas de aceite mineral en grupos de 20 cigotos por placa petri por 7 días a 38.5 °C en una incubadora con mezcla de gases. Para ello, se utilizó el medio SOF base (Vajta *et al.*, 2000) suplementado con 0.044 g/l de piruvato de sodio, 0.039 g/l de L-glutamina, 3.0 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA-FAF), 1X de aminoácidos esenciales, 1X de aminoácidos no esenciales, 10 mg/ml de EGF, 0.1 mg/ml de ácido cítrico, 0.5 mg/ml de myo-inositol, 50 µg/ml de gentamicina y 2% de SFB.

Luego de los 7 días, los embriones resultantes fueron clasificados según la metodología descrita por la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 2011) usando un estereoscopio (Olympus, Japón) a un aumento de 20X.

Sincronización de Receptoras y Transferencia de Embriones

Para la selección de las vacas receptoras se visitaron las ganaderías locales para determinar las condiciones sanitarias, edad (1.6-5 años), número de partos (0-4 partos) y condición corporal (2.5-3) de los animales. Se utilizaron hembras cruzadas, descartándose vacas preñadas y con anomalías reproductivas mediante ecografía. Cincuenta vacas candidatas a receptoras fueron sometidas a un protocolo de sincronización de estro, donde el día cero se aplicó progesterona 1.38 g (DIB®, Zoetis) y benzoato de estradiol 2 mg (Estrovet®, Montana), el día 10 se retiró la progesterona y se aplicó benzoato de estradiol 2 mg (Estrovet®, Montana), 400 UI de gonadotropina coriónica equina (ECG) (Novormon®, Intervet) y 25 mg de prostaglandina F_{2a} como luteolítico (Lutalyse®, Pfizer). Lamentablemente, solo se presentó celo en 14 receptoras, las mismas que fueron usadas para la transferencia de embriones en estadio de mórula (8) o blastocisto (6) en el día 19.

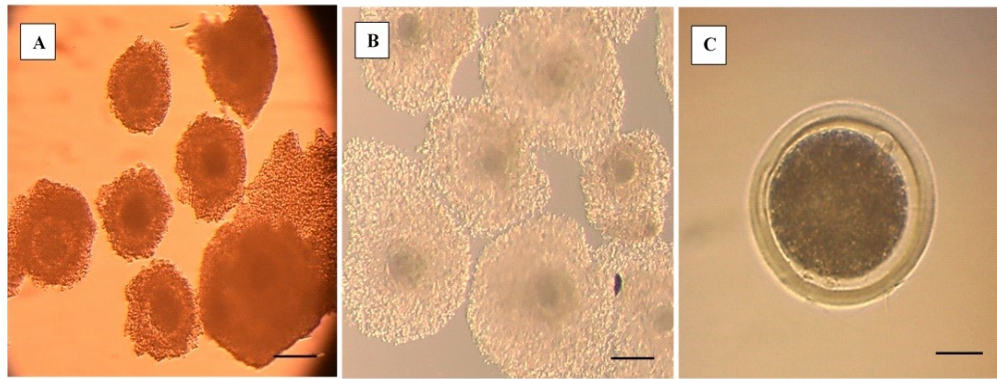


Figura 1. Observación de complejos cúmulo-ovocitos (COC). A. COC antes de la maduración *in vitro*. B. COC posterior a la maduración *in vitro*. Se observa expansión de las células del *cumulus oophorus*. C. Aparición del corpúsculo polar en el espacio perivitelino del ovocito (la barra representa 100 µm en A y B, y 25 µm en C)

Se transfirieron los embriones generados del grupo experimental (COC vitrificados) seleccionados según su calidad, los cuales fueron transportados en bolsas selladas con mezcla de gases atemperadas a 37 °C hasta el centro poblado de Chontapampa, distrito de Quinjalca, Chachapoyas. Para la transferencia de los embriones, se verificó la presencia de cuerpo lúteo (CL) por palpación (CL >16 mm) para confirmar la aptitud de la vaca como receptora de embrión. Las transferencias se realizaron utilizando una pistola de transferencia de embriones (21") con fundas punta de acero (Agtech, USA), revestida con una camiseta sanitaria. La pistola fue dirigida al cuerno ipso lateral del CL funcional, depositando el embrión en el tercio craneal del cuerno uterino. El diagnóstico de gestación se realizó a los 35 días de transferido el embrión, mediante ultrasonografía transrectal (Esaote, Italia).

Análisis Estadístico

Se calculó el intervalo de confianza del 95% y el valor de probabilidad mediante la prueba de Chi cuadrado para los porcentajes de embriones (mórulas y blastocistos), obtenidos *in vitro* a partir del grupo control (sin

vitrificación) y el grupo experimental (ovocitos vitrificados). Los datos obtenidos se analizaron en el programa SPSS v. 15.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1: Competencia Meiótica *in vitro* de los Ovocitos

Las propiedades asociadas con cada etapa de la meiosis hasta la metafase de la segunda división meiótica (metafase II), incluyen el acoplamiento metabólico entre los ovocitos y las células del cúmulo (COC), la permeabilidad de la membrana plasmática, la presencia o ausencia de una membrana nuclear, la reorganización del citoesqueleto y el huso acromático, y la condensación de los cromosomas (Sprícigo *et al.*, 2014). En el estudio, el 82% de los COC madurados *in vitro* por 22 h alcanzaron la metafase II (Cuadro 1), mostrando la expansión de las células del *cumulus* (Figura 1B), la extrusión del corpúsculo polar (Figura 1C), la desaparición de la vesícula germinal y la formación de la placa metafásica (Figura 2A,B); indicando la llegada al estadio nuclear de metafase II. Estos resultados son similares a lo reportado por

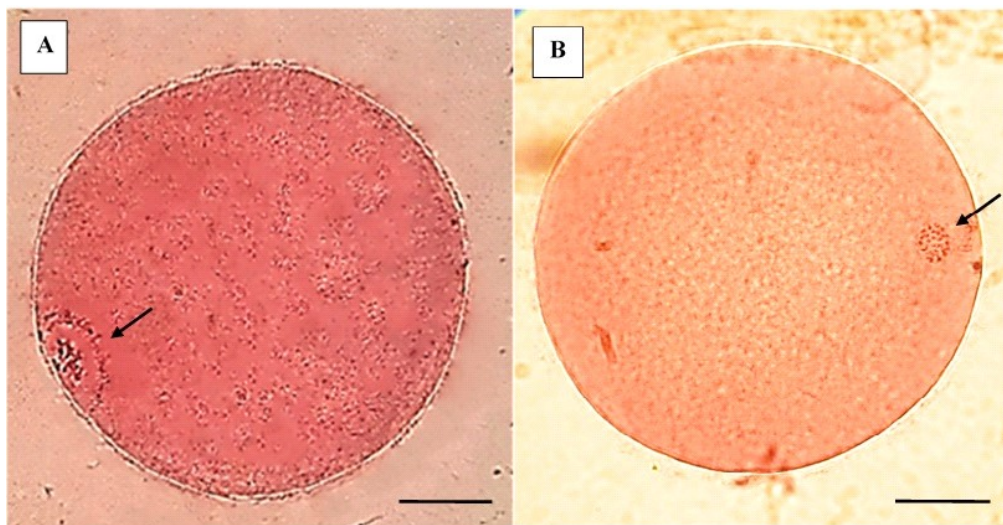


Figura 2. Determinación del estadio nuclear de los COC con aceto-orceína. A. Ovocito en estadio de vesícula germinal (VG). Presenta membrana nuclear intacta y la cromatina en el nucleoplasma. B. Ovocito maduro (metafase II - MII). Presenta cromosomas condensados y la ausencia de la membrana nuclear (la barra representa 25 μm)

Cuadro 2. Desarrollo embrionario *in vitro* a los siete días de ovocitos bovinos que no fueron sometidos a la vitrificación (control) y de ovocitos con proceso de vitrificación previa (experimental)

Grupo	n	Degenerados n (%)	<32 células n (%)	Mórulas n (%)	Blastocistos n (%)
Control	181	42 (23.2)	73 (40.3)	21 (11.6) ^a	45 (24.9) ^a
Experimental	154	87 (56.5)	42 (27.3)	9 (5.8) ^a	16 (10.4) ^b

^{a,b} Letras diferentes dentro de columnas indica diferencia significativa ($p < 0.05$)

diversos autores (Lancellotti Schwarz *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2015; Bezerra *et al.*, 2016).

Experimento 2: Competencia de Desarrollo Embrionario *in vitro*

Con la finalidad de comparar el desarrollo embrionario *in vitro* a partir de ovocitos sin previa vitrificación (control) y con previa vitrificación (experimental), un segundo gru-

po de COC (335) fueron madurados *in vitro* por 22 h. Luego, se dividieron aleatoriamente en dos grupos, el primero (181 COC como control) fue usado inmediatamente para fecundarlos y cultivarlos *in vitro* por siete días. El segundo grupo (154 COC), fueron vitrificados y mantenidos en nitrógeno líquido por tres semanas para posteriormente descongelarlos, fecundarlos y cultivarlos *in vitro* (Figura 3).

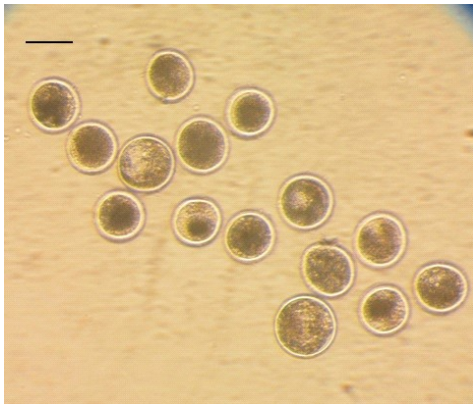


Figura 3. Embriones producidos *in vitro* a partir de ovocitos vitrificados (la barra representa 100 μm)



Figura 4. Ecografía a los 35 días pos-transferencia embrionaria en una vaca. La flecha indica la vesícula embrionaria dentro del líquido amniótico

Se observó que el desarrollo embrionario del grupo experimental fue significativamente reducido por efecto de la vitrificación; obteniendo un 5.8% de mórulas y 10.4% de blastocistos en comparación con el grupo control (sin proceso de vitrificación), donde se obtuvo una tasa de 11.6% de mórulas y 24.9% de blastocistos (Cuadro 2). Estos porcentajes son similares a los encontrados por Liang *et al.* (2015) quienes obtuvieron una tasa 8.9% de blastocistos a partir de

ovocitos bovinos vitrificados, pero superiores a los reportados por Sprícigo *et al.* (2014) quienes reportaron una tasa de 4.1% de blastocistos a partir de ovocitos maduros vitrificados en cryotops. La reducción significativa en el desarrollo de blastocisto en comparación al del grupo control, demostró que la vitrificación tiene efectos negativos a largo plazo en el desarrollo de los embriones. El mecanismo exacto del daño se desconoce, pero la despolimerización del huso causado por crioprotectores, así como la desorganización del citoesqueleto, combinada con el enfriamiento, podrían haber sido las causas (Dinnyés *et al.*, 2000).

Experimento 3: Tasa de Concepción a los 42 Días

Con el objetivo de evaluar la capacidad de implantación de los embriones que se generaron *in vitro* a partir de COC vitrificados (grupo experimental), se transfirieron estos embriones a receptoras previamente sincronizadas. Lamentablemente, la falta de disponibilidad de receptoras solo permitió la transferencia de 14 embriones a 14 receptoras. De estos, ocho embriones fueron transferidos en estado de mórula y seis como blastocistos, clasificados por su calidad. El 21.4% de los embriones transferidos (2 blastocistos y 1 mórula) lograron formar vesícula embrionaria a los 35 días de realizada la transferencia (Figura 4).

La baja proporción de gestaciones logradas podría deberse a que las muestras utilizadas provenían de vacas sacrificadas, donde factores como la restricción de oxígeno y flujo sanguíneo podrían haber dañado la estructura del ovario y, por consiguiente, la viabilidad de los ovocitos. De igual manera, los animales usados para la transferencia no disponían de un sistema adecuado de manejo (Colazo y Mapletoft, 2007). Resultados exitosos de gestación y nacimiento de crías vivas a partir de embriones vitrificados han sido reportados. Así, Sanches *et al.* (2016) obtuvieron 35.9% de gestación.

CONCLUSIÓN

Los ovocitos bovinos maduros, vitrificados y fecundados *in vitro* tienen la capacidad de desarrollar hasta la etapa de blastocisto y lograr convertirse en vesículas embrionarias posterior a la transferencia.

Agradecimientos

Se agradece al Programa de Becas de Maestría del Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica, por el financiamiento del trabajo de investigación.

LITERATURA CITADA

1. **Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Paixao CL, Pereira PC. 2010.** Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum Reprod* 25: 1192-1198. doi: 10.1093/humrep/deq042
2. **Bezerra FTG, Silva AWB, Rissi VB, Rosa PA, Cesaro MP, Costa JJN, Gonzales PBD, Silva JRV. 2016.** Cilostamide and follicular hemisections inhibits oocyte meiosis resumption and regulate gene expression and cAMP levels in bovine cumulus-oocyte complexes. *Livestock Sci* 184: 112-118. doi: 10.1016/j.livsci.2015.12.014
3. **Braude P. 2006.** One child at a time: reducing multiple births after IVF. Report of Expert Group on Multiple Births after IVF. [Internet]. Available in: <https://ifqlive.blob.core.windows.net/umbraco-website/1311/one-child-at-a-time-report.pdf>
4. **Chaves DF, Corbin E, Almiñana C, Locatelli Y, Souza-Fabjan JMG, Bhat MH, et al. 2017.** Vitrification of immature and *in vitro* matured bovine cumulus-oocyte complexes: effects on oocyte structure and embryo development. *Livest Sci* 199: 50-56. doi: 10.1016/j.livsci.2017.02.022
5. **Colazo MG, Mapletoft R. 2007.** Estado actual y aplicaciones de la transferencia de embriones en bovinos. *Cienc Vet* 9: 20-37.
6. **Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000.** High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 63: 513-518. doi: 10.1095/biolreprod63.2.513
7. **Hirao Y, Tsuji Y, Miyano T, Okano A, Miyake M, Kato S, Moor RM. 1995.** Association between p34cdc2 levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. *Zygote* 3: 325- 332. doi: 10.1017/S0967199400002756.
8. **[IETS] International Embryo Transfer Society. 2011.** Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. USA: IETS.
9. **Kuwayama M. 2007.** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. *Theriogenology* 67: 73-80. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.014
10. **Lancellotti Scwarz KR, Lisboa Pires PR, Garcia Mesquita L, Chiaratti MR, Verde Leal CL. 2014.** Effect of nitric oxide on the cyclic guanosine monophosphate (cGMP) pathway during meiosis resumption in bovine oocytes. *Theriogenology* 81: 556-564. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.11.008
11. **Liang S, Yuan B, Kwon JW, Ahn M, Cui XS, Bang JK, Kim NH. 2015.** Effect of antifreeze glycoprotein 8 supplementation during vitrification on the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 86: 485-494. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.032
12. **Liebfried L, First N. 1979.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 48: 76-86. doi: 10.2527/jas1979.48176x

13. **Marco-Jiménez F, Jiménez-Trigos E, Almela-Miralles V, Vicente JS. 2016.** Development of cheaper embryo vitrification device using the minimum volume method. PLoS One 11(2): e0148661. doi: 10.1371/journal.pone.0148661
14. **Martins L, Paulino E, Alves A, Amaral W, Osório T, Martins, M. 2004.** Vitri-ficação de ovócitos desnudados ou não e previamente maturados *in vitro*. Rev Bras Zootec 33: 1128-1134. doi: 10.1590/S1516-35982004000500004
15. **Men H, Monson RL, Parrish JJ, Rutledge JJ. 2003.** Degeneration of cryopreserved bovine oocyte via apoptosis during subsequent culture. Cryobiology 47: 73-81. doi: 10.1016/S0011-2240(03)00070-1
16. **Motlik J, Fulka J. 1976.** Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. J Exp Zool 198: 155-162. doi: 10.1002/jez.1401980205
17. **Parrish J, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. 1995.** Effect of bovine sperm separation by swim up or Percoll on success of *in vitro* fertilization and embryo development. Theriogenology 44: 859-870. doi: 10.1016/0093-691X(95)-00271-9
18. **Pegg D. 2002.** The history and principles of cryopreservation. Semin Reprod Med 20: 5-13. doi: 10.1055/s-2002-23515
19. **Pugh PA, Tervit HR, Niemann H. 2003.** Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine *in vitro* produced embryos following in straw-dilution, *in vitro* and *in vivo* following transfer. Anim Reprod Sci 58: 9-22. doi: 10.1016/S0378-4320(99)-00087-1
20. **Roy TK, Brandi S, Tappe NM, Bradley CK, Vom E, Henderson C, et al. 2014.** Embryo vitrification using a novel semi-automated closed system yields *in vitro* outcomes equivalent to the manual Cryotop method. Hum Reprod 29: 2431-2438. doi: 10.1093/humrep/deu214
21. **Sanches BV, Lunardelli PA, Tannura JH, Cardoso BL, Pereira MH, Gaitkoski D. 2016.** A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. Theriogenology 85: 1147-1151. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.029
22. **Sprícigo JF, Morais K, Ferreira AR, Machado GM, Gomes AC, Rumpf R, Franco MM, et al. 2014.** Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. Cryobiology 69: 256-265. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.-07.015
23. **Vajta G, Peura TT, Holm P, Páldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. 2000.** New method for culture of zona-included or zona free embryos: the well-of-the-well (WOW) system. Mol Reprod Dev 55: 256-264. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<256:::AID-MRD3>3.0.CO;2-7