

ARTÍCULO ORIGINAL

## Viabilidad después de la vitrificación de embriones de cerda y oveja producidos *in vitro*

F. Fernández Reyes<sup>I,II</sup>, J.E. Hernández Pichardo<sup>I,II</sup>, J.G. Romero Ramírez<sup>I,II</sup>,  
J.L. Rodríguez Suastégui<sup>I</sup>

<sup>I</sup>Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X). Calzada del Hueso 1100, Colonia Villaquietud, Delegación Coyoacán, CP. 04960, México, D.F. Correo electrónico: [freyes@correo.xoc.uam.mx](mailto:freyes@correo.xoc.uam.mx);

<sup>II</sup> Cuerpo Académico Manejo de la Reproducción Animal

**RESUMEN:** El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la viabilidad después de la vitrificación de embriones de cerda y oveja producidos *in vitro*. Los Complejos Ovocito-Células del Cúmulo (COCs) fueron obtenidos por punción de folículos de 3 a 6 mm de diámetro a partir de ovarios colectados en rastro. La viabilidad fue evaluada en tres grupos de embriones: sin vitrificar (grupo control), después de la vitrificación (calentamiento) y a 72 horas de cultivo después del calentamiento. La vitrificación se realizó en dos pasos; se inicio con etilén glicol (EG) 4% (v/v) y suero fetal bovino (SFB) 20%, en TCM-199 a 37 °C por 15 minutos, posteriormente fueron transferidos a solución de vitrificación EG 35%, trehalosa 0.4 M y SFB 20% en TCM-199, finalmente fueron colocados en pajillas abiertas biseladas (BES). Las pajillas fueron sumergidas y conservadas en nitrógeno líquido por una semana. En cerdas el grupo control presentó una viabilidad total de 74,3% y los embriones de 8-16 blastómeros y mórulas tuvieron el 100% de viabilidad. La viabilidad total en los embriones calentados fue de 49,3% y la mayor viabilidad la presentaron los embriones de 8-16 blastómeros 63,7% y las mórulas 61,7%, aunque la diferencia no fue significativa ( $p>0.05$ ). En ovejas el grupo control tuvo una viabilidad de 100% en todos los diferentes estadios de desarrollo embrionario. La viabilidad total en los embriones calentados fue de 63,1% y la mayor viabilidad la presentaron las mórulas 76,1% y los embriones de 8-16 blastómeros 68,1%, aunque la diferencia no fue significativa ( $p>0.05$ ). La viabilidad obtenida después de 72 horas de cultivo de los embriones calentados fue de 1.5% de mórulas de cerda y 2.8% de blastocistos de oveja; en este último hubo cambio de estadio de dos mórulas a blastocisto. Se concluye que el procedimiento de vitrificación en pajilla abierta biselada usando etilén glicol y trehalosa como crioprotectores permitió la recuperación de embriones de cerda y oveja viables al momento de la desvitrificación, aunque el desarrollo posterior a este proceso disminuye su desarrollo.

**Palabras clave:** cerda, oveja, vitrificación, viabilidad, embrión, maduración *in vitro*, fertilización *in vitro*.

---

### Viability after vitrification of sow and sheep embryos produced *in vitro*

**ABSTRACT:** This study was aimed to assess the viability after vitrification of sow and sheep embryos produced *in vitro*. Complexes Oocyte-cumulus cells (COCs) were obtained from ovaries collected from sows and sheeps in the slaughterhouse. The viability was evaluated in three groups of embryos: unvitrified (control group), after vitrification (warming) and at 72 hours of culture after warming. The vitrification used two steps with ethylene glycol (EG) 4% (v/v), fetal bovine serum (FBS) 20%, in TCM-199 at 37 °C for 15 minutes, then the embryos were transferred to a vitrification solution of 35% EG, 0.4 M trehalose, and 20% FBS in TCM-199 for 20 seconds and finally placed in beveled edge open straws (BES). The straws were immersed and kept in liquid nitrogen for a week. The total viability of the vitrified/warmed embryos from sows was 49.3%, and the highest viabilities were shown by the 8-16 blastomere embryos (63.7%) and the morulae (61.7%), though the differences were not statistically significant. The total viability in the control group was of 74.3%, and the 8-16 blastomere embryos and morulae had 100% of viability. The total viability of the vitrified/warmed embryos from sheeps was 63.1%, and the highest viabilities were shown by the morulae (76.1%) and the 8-

16 blastomere embryos (68.1%), though the differences were not statistically significant. The total viability in the control group was 100% in all the different stages of the embryonic development. The viability obtained after culturing the vitrified/warmed embryos for 72 hours was 1.5% of sow morulae and 2.8% of sheep blastocysts; in the latter, two morulae changed to blastocysts. It is concluded that the vitrification procedure in beveled edge open straws using ethylene glycol and trehalose as cryoprotectants allowed recovering of sow and sheep embryos viable at the devitrifying moment, but their further development is reduced.

**Key words:** sow, sheep, vitrification, viability, embryo, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization.

## INTRODUCCIÓN

Para la obtención de embriones *in vitro* se requiere de la maduración de ovocitos y de su fertilización *in vitro*. En años recientes se han realizado estudios para conocer cuáles son las condiciones necesarias durante el proceso de cultivo para maximizar su producción. Se observó que la maduración citoplásmica y nuclear, así como la fertilización, la formación de pronúcleos y la división, son influenciados por factores que contienen los fluidos foliculares y oviductales, componentes del suero, hormonas esteroides y gonadotropinas (1). De manera natural las células foliculares proveen de nutrientes al ovocito y de energía a las células de la granulosa (2). Por lo que es importante considerar el tamaño del folículo y las capas de células de la granulosa que conforman al complejo ovocito células del cúmulo (COCs).

La importancia de los cerdos como modelo en las investigaciones biomédicas se ha incrementado sobre todo por considerarse de bajo costo; sin embargo los embriones porcinos son excesivamente sensibles a bajas temperaturas y el éxito en la criopreservación generalmente se limita al uso de la vitrificación en un sistema abierto, que permite el contacto directo del embrión con el nitrógeno líquido (3). La disminución en su desarrollo de los embriones vitrificados puede deberse al tiempo requerido para la remoción del nitrógeno líquido o al medio de calentamiento (4). Por otra parte la vitrificación de ovocitos reduce la capacidad de fertilización *in vitro* y baja capacidad de desarrollo, como consecuencia de la alteración en la permeabilidad de la membrana plasmática (5). Con la vitrificación se han observado en ovocitos alteraciones en el citoesqueleto, en las funciones de la mitocondria y la disminución en la habilidad de las defensas antioxidantes (6).

La viabilidad de los ovocitos o embriones vitrificados en muchos casos no es valorada antes de continuar su desarrollo después de la vitrificación, debido a que se asume que son viables porque alcanzan su maduración o su fertilización, así como su desarrollo embrionario. Así en embriones de ovino se considera que son viables al valorar cambios en su desarrollo o bien al lograr la gestación y el nacimiento de crías (7) o por

la re-expansión y formación de blastocistos (8). Sin embargo, una gran cantidad de ovocitos y embriones no sobreviven al proceso de vitrificación disminuyendo su número conforme avanza su desarrollo *in vitro* o *in vivo*. Lo cual ha llevado a buscar otras alternativas de procedimientos de vitrificación, como ejemplo se tiene la substitución del suero fetal por polímeros (9). También se ha observado que las bajas concentraciones de calcio en el medio de vitrificación están asociadas a un mayor desarrollo de blastocistos (10).

Considerando que una alternativa para preservar el material genético de animales sobresalientes puede ser la criopreservación de embriones, el objetivo del presente trabajo fue realizar la vitrificación y evaluar la viabilidad después del calentamiento de embriones de cerda y oveja producidos *in vitro* usando etilén glicol y trehalosa en pajilla abierta biselada (adaptación realizada a la pajilla de 0,25 mL).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta y maduración *in vitro* de ovocitos.

Los ovarios se colectaron en el rastro, a partir de cerdas y ovejas púberes recién sacrificadas y se transportaron al laboratorio a una temperatura de 26 °C en un tiempo menor de 2 horas. Se puncionaron y aspiraron los folículos ováricos con un diámetro de 3 a 6 mm, utilizando una jeringa desechable de 10 mL y una aguja hipodérmica de 18 x 38 mm para la obtención del líquido folicular, el cual se dejó sedimentar en cerda por tres periodos de 15 minutos. A partir del sedimento se obtuvo el paquete celular, que se lavó dos veces con medio modificado de Tyrode suplementado con lactato de sodio, Hepes y PVA (TL-Hepes-PVA), con un pH de 7.3 a 7.4. En el caso de ovejas se puncionaron y aspiraron folículos del mismo tamaño que en cerdas, pero a la solución de lavado se adicionó 5 UI de Heparina/mL y solamente se realizó un periodo de sedimentación de 15 minutos (11). En ambas especies bajo el microscopio estereoscópico, se seleccionaron los Complejos Ovocito-Células del Cúmulo (COCs), eligiéndose aquellos que presentaron citoplasma uniforme y que estaban rodeados por una masa

completa de cuatro capas de células del cúmulo. Los ovocitos seleccionados, fueron cultivados para su maduración en medio para cultivo de tejidos TCM-199 con sales de Earle y bicarbonato, suplementado con PVA al 0.1%, D-glucosa 3.05 mM, piruvato de sodio 0.91 mM, cisteína 0.57 mM y factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/mL (12,13). Se depositaron de 30 a 40 COCs por pozo, en una caja de 4 pozos conteniendo 500  $\mu$ L de medio de maduración en cada uno. Posteriormente, cada pozo fue cubierto con una capa de aceite mineral y finalmente se le agregaron 1.5 U.I. de Merional (IBSA, Suiza), (equivalente a 1.5 U.I. de LH y 1.5 U.I. de FSH) (14). Las cajas se incubaron a 39 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y humedad a saturación, durante 44 horas los ovocitos de cerda (12) y por 24 horas los ovocitos de oveja (15).

### Fertilización *in vitro*

A los ovocitos de cerda una vez transcurrido el tiempo de maduración a cada pozo, se agregaron 300  $\mu$ L de hialuronidasa al 0.1% para eliminar las células del cúmulo. Los ovocitos fueron desnudados mecánicamente, utilizando una pipeta Pasteur y posteriormente fueron transferidos a gotas de 50  $\mu$ L de medio de fertilización Tris-Buffered-Medium (TBM), suplementado con cafeína 2.5 mM y BSA fracción V, al 0.4%. Las gotas, en cajas de 4 pozos, son cubiertas con aceite mineral, e incubadas a 39 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación (12). Posteriormente los ovocitos fueron fertilizados usando semen congelado. El proceso de descongelación del semen se realizó a 37 °C por 45 segundos en una solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco (DPBS) suplementada con BSA fracción V al 0.1%, a un pH de 7.2-7.3 y se centrifugó a 1900 x g 5 min, el paquete celular es diluido en TBM. Después de hacer las diluciones apropiadas, 50  $\mu$ L de esta suspensión de espermatozoides se agregaron a una gota de 50  $\mu$ L del medio de fertilización, que contenía a los ovocitos, para obtener así la concentración final deseada 5 X 10<sup>5</sup> de células espermáticas/mL y se llevó a cabo la coincubación por un periodo de 5 horas (12). En el caso de los ovocitos de oveja, no se desnudaron y se fertilizaron con semen congelado bajo el mismo procedimiento utilizado en ovocitos de cerda, agregando 250  $\mu$ L del medio de fertilización a una gota del mismo volumen, para obtener una concentración de espermatozoides 1 X 10<sup>6</sup> y fueron coincubados por un periodo de 21 horas (11).

### Desarrollo embrionario *in vitro*

Transcurrido el tiempo de coincubación los cigotos de cerda se lavaron y fueron transferidos a gotas de 500  $\mu$ L de medio de desarrollo embrionario North Carolina State University (NCSU-23) (16). En los ovinos una

vez transcurrido el tiempo de coincubación los cigotos fueron lavados y transferidos a gotas de 500  $\mu$ L de medio de desarrollo embrionario Fluido Oviductual Sintético (SOF) (IN VITRO, México), (11,17). Los dos grupos fueron incubados a 39 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y humedad a saturación, durante 144 horas. Transcurrido este tiempo se evaluó el desarrollo embrionario.

La evaluación del desarrollo embrionario consistió en clasificar a los embriones de acuerdo al número de blastómeros o etapa de desarrollo (mórula o blastocisto), posteriormente se determinó la calidad morfológica de los embriones en base a los criterios propuestos por Stringfellow y Seidel, (18):

Calidad 1. Excelente. Embrión compacto (la masa celular debe ser mayor al 85%), esférico, de color claro, desarrollo de acuerdo a su edad, pocas vesículas, sin desechos celulares, ni blastómeros extruidos.

Calidad 2. Bueno. Embrión compacto o con una leve descompactación (por lo menos el 50% de las células deben estar intactas), poco irregular, color uniforme, desarrollo de acuerdo a su edad, presencia de pocas vesículas y blastómeros extruidos, pocos desechos celulares.

Calidad 3. Regular. Descompactación, muy marcada (por lo menos el 25% de las células deben estar intactas), desechos celulares, color oscuro o zonas claras y oscuras, vesículas, blastómeros extruidos y masa pequeña.

Calidad 4. Malo o no Transferible. Embrión con una degeneración muy marcada, masa pequeña (menor al 25% de lo normal), color oscuro, descompactación, vesículas e irregularidades en los blastómeros.

La viabilidad fue evaluada en tres grupos de embriones; 1) sin vitrificar (grupo control), 2) después de la vitrificación al momento del calentamiento y 3) a 72 horas de cultivo después del calentamiento. Para evaluar la viabilidad los embriones fueron puestos en solución de MTT (azul de tiazolil) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) por un lapso de 2 horas.

### Vitrificación de embriones

Una vez que se obtuvieron los embriones *in vitro* de porcino y ovino, se procedió a la vitrificación de los embriones clasificados con categoría 1 y 2 en ambas especies, usando un medio de equilibrio que contiene etilén glicol (EG) 4% (v/v) y suero fetal bovino (SFB) 20%, en TCM-199 a 37°C por 15 minutos, posteriormente se transfirieron a solución de vitrificación que consistía en EG 35%, trehalosa 0.4 M y SFB 20% en TCM-199 por 20 segundos a 37°C y se colocaron en

pajillas abiertas biseladas (BES), (19). Las pajillas se sumergieron en nitrógeno líquido y se conservaron por una semana. Para el calentamiento (desvitrificación), las muestras se colocaron por 3 minutos en tres soluciones contentivas de 800 µL de medio TCM-199 + SFB 10% y diferentes concentraciones de trehalosa 0.3 M, 0.2 M y 0.1 M, de acuerdo al procedimiento adaptado de Al-Aghbari & Menino (15). Una vez desvitrificados los embriones fueron divididos en dos grupos; en uno se evaluó la viabilidad con azul de tiazolil (MTT) al momento del calentamiento (desvitrificación) y en el otro se evaluó la viabilidad con la misma tinción después de su incubación. Estos embriones fueron lavados y colocados en medio de cultivo específico para cada especie NCSU-23 (16) ó SOF (11), respectivamente e incubados por 72 horas (7).

### Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante la prueba de independencia de Chi-cuadrada por cada una de las etapas de desarrollo, por grupos y especie (20).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de viabilidad obtenidos en mórulas de cerda después del calentamiento (Tabla 1), son similares al 67% a 74% de supervivencia que reportan Sanchez-Osorio *et al.* (21), al vitrificar mórulas obtenidas *in vivo*. Se ha observado que la delipidación de mórulas aumenta su supervivencia después de la vitrificación a 82,5% Esaki *et al.* (22) y puede llegar al

95% Ushijima *et al.* (23), pero al no retirar los lípidos antes de la vitrificación estos últimos autores mencionan que la viabilidad disminuye a 57%. Por otra parte la viabilidad obtenida en los embriones de 8-16 blastómeros fue mayor al 50% citado por Nagashima *et al.* (24), para este mismo estadio de desarrollo embrionario. Los resultados indican que el procedimiento utilizado en el presente trabajo fue favorable para obtener viabilidad en embriones de cerda en diferentes estadios de desarrollo embrionario. Así mismo se observó que los embriones en etapas de mayor desarrollo sobreviven más al proceso de vitrificación. Posiblemente el recipiente utilizado también pudo contribuir en los resultados de viabilidad obtenidos ya que Arav *et al.* (25), indican que el volumen de la solución de vitrificación incrementa la proporción de enfriamiento y resulta en una vitrificación exitosa.

El porcentaje de viabilidad de los embriones de oveja obtenido en el presente estudio después del calentamiento fue mayor en los embriones con estadios más avanzados de desarrollo (Tabla 2), siendo similares a los resultados reportados por Shirazi *et al.* (8), ellos observaron una mayor supervivencia a la vitrificación de embriones de 16 blastómeros que de 8. La viabilidad total obtenida en los embriones queda dentro del rango del 50% a 93% de viabilidad de blastocistos reportado por Zhu *et al.* (26). Aunque la viabilidad de los embriones vitrificados en etapa de blastocisto puede disminuir cuando la recuperación de la re-expansión de los blastocistos calentados sucede en un periodo de 8 horas que cuando ocurre a las 16 horas (7). El procedimiento de vitrificación uti-

**TABLA 1.** Desarrollo embrionario y viabilidad de embriones de cerda frescos y calentados./ *Embryonic development and viability of fresh and vitrified/warmed sow embryos.*

Grupos	Ovocitos cultivados y fertilizados	Clasificación de Embriones y viabilidad				
		0 Blastómeros %	2-4 Blastómeros %	8-16 Blastómeros %	Mórulas %	Viabilidad Total %
Desarrollados/ Total por etapa (%)	390	26,9	25,1	22,5	25,3	54,3*
Viables Frescos/Total por etapa (%)	78	59,1	100	100	100	74,3
Viables Calentados/Total por etapa (%)**	312	23,2	40,2	63,7	61,7	49,3

\* Se sumaron los viables frescos y desvitrificados. Fueron considerados viables aquellos embriones que presentaron más de la mitad de sus blastómeros teñidos.

\*\* La viabilidad fue evaluada al momento del calentamiento y no se observó ninguna diferencia estadística significativa ( $p > 0.05$ ) entre las diferentes etapas de desarrollo.

lizado en embriones de oveja en el presente estudio fue favorable para obtener viabilidad en los diferentes estadios de desarrollo embrionario y el recipiente utilizado también pudo contribuir en los resultados de viabilidad obtenidos. Estos resultados indican que la vitrificación de embriones es factible y que puede superar al bajo porcentaje de división y desarrollo que sufren los ovocitos de ovino vitrificados para llegar a la etapa de blastocisto (27).

Los embriones de oveja tuvieron un mejor comportamiento en su desarrollo en el cultivo *in vitro* después del calentamiento (Tabla 3), aunque estadísticamente la diferencia no fue significativa ( $p > 0.05$ ). Se confirma lo citado por Gil *et al.* (28), quienes reportan que el porcentaje de desarrollo embrionario *in vitro* en porcino es bajo y de baja calidad. Aunque Nagashima *et al.* (29), mencionan que los embriones en mayor estadio de desarrollo presentan mayor viabilidad al ser criopreservados. En el presente estudio sólo las

mórulas fueron las que presentaron viabilidad a 72 horas de cultivo después del calentamiento y en oveja hubo cambio de estadio de 2 mórulas a blastocisto. Estos resultados confirman que existen diferencias de ovocitos y embriones entre especies, lo cual dificulta la aplicación de la técnica de vitrificación como lo reportan Saragusty y Arav, (30). Por otra parte se tiene conocimiento de que embriones de ovino producidos *in vivo* y congelados sufren alteraciones estructurales debidas al procedimiento de congelación (31). La ausencia de desarrollo hasta blastocisto y la disminución en la supervivencia de los embriones obtenidos *in vitro* y vitrificados en el presente estudio, pudo ser consecuencia de los cambios de presión osmótica en el interior del embrión justo después del calentamiento, ya que ésta es muy alta por el contenido de crioprotectores y por consiguiente puede ocurrir una afluencia rápida de agua y causar un choque osmótico como lo mencionan Cuello *et al.* (32).

**TABLA 2.** Desarrollo embrionario y viabilidad de embriones de ovino frescos y calentados./ *Embryonic development and viability of fresh and vitrified/warmed sheep embryos.*

Grupos	Ovocitos cultivados y fertilizados	Clasificación de Embriones y viabilidad				
		0 Blastómeros %	2-4 Blastómeros %	8-16 Blastómeros %	Mórulas %	Viabilidad Total %
Desarrollados/ Total por etapa (%)	74	12,1	14,8	37,8	35,1	71,6*
Viables Frescos/Total por etapa (%)	17	100	100	100	100	100
Viables Calentados/Total por etapa (%)**	57	80	11,1	68,1	76,1	63,1

\*Se sumaron los viables frescos y desvitrificados. Fueron considerados viables aquellos embriones que presentaron más de la mitad de sus blastómeros teñidos.

\*\*La viabilidad fue evaluada al momento de la desvitrificación, los embriones de 8-16 blastómeros y mórulas presentaron una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) al compararlos con los de 2-4 blastómeros.

**TABLA 3.** Viabilidad de embriones de cerda y oveja, vitrificados y calentados (cultivados *in vitro* por 72 horas)./ *Viability of vitrified/warmed embryos from sows and sheeps (cultured in vitro for 72 hours).*

Especie	Embriones Calentados	Clasificación de Embriones Calentados (%)				Viabilidad Total a 72 horas %
		2-4 Blastómeros %	8-16 Blastómeros %	Mórulas %	Blastocistos %	
Porcino	64	34,3	12,5	51,5	1,5	1,5*
Ovino	69	14,4	27,5	55	2,8	2,8**

\* Sólo una mórula se mantuvo viable después de 72 horas de cultivo, pero no hubo cambio en el desarrollo.

\*\* Dos mórulas cambiaron en su desarrollo a blastocisto y fueron viables después de 72 horas de cultivo.

Se concluye que el procedimiento de vitrificación en pajilla abierta biselada usando etilén glicol y trehalosa como crioprotectores permitió la recuperación de embriones de porcino y ovino viables al momento del calentamiento (desvitrificación), siendo los estadios de 8-16 blastómeros y mórulas los de mayor viabilidad, aunque el desarrollo *in vitro* posterior a este proceso disminuye su desarrollo.

Los resultados obtenidos de viabilidad con la pajilla abierta biselada (BES) propuesta en el presente trabajo puede ser una opción como recipiente a usar por el bajo costo y los beneficios que puede representar.

### AGRADECIMIENTOS

A los rastros Los Arcos y El Rojo, del estado de México, por proporcionar los ovarios.

### REFERENCIAS

1. Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Ahmadi E, Heidari B. Effects of growth hormone on nuclear maturation of ovine oocytes and subsequent embryo development. *Reprod Dom Anim.* 2010;45:530-536.
2. Wani NA. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rum Res.* 2002;44:89-95.
3. Men H, Zhao C, Si W, Murphy CN, Spate L, Liu Y, et al. Birth of piglets from in vitro-produced, zona-intact porcine embryos vitrified in a closed system. *Theriogenology.* 2011;76(2):280-289.
4. Gomis J, Cuello C, Sanchez-Osorio J, Gil MA, Maside C, del Olmo D, et al. Non-surgical deep intrauterine transfer of superfine open pulled Straw (SOPS)-vitrified porcine embryos: evaluation of critical steps of the procedure. *Theriogenology.* 2012;78(6):1339-1349.
5. Vallorani C, Spinaci M, Bucci D, Porcu E, Tamanini C, Galeati G. Pig oocyte vitrification by Cryotop method and the activation of the apoptotic cascade. *Anim Reprod Sci.* 2012;135:68-74.
6. Somfai T, Kikuchi K, Nagai T. Factors affecting cryopreservation of porcine oocytes. *J Reprod Dev.* 2012;58(1):17-24.
7. Leoni GG, Berlinguer F, Succu S, Bebbere D, Mossa F, Madeddu M, et al. A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. *Mol Reprod Dev.* 2008;75(2):373-382.
8. Shirazi A, Soleimani M, Karimi M, Nazari H, Ahmadi E, Heidari B. Vitrification of *in vitro* produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology.* 2010;60(2):204-210.
9. Marco-Jimenez F, Belinguer F, Leoni GG, Succu S, Naitana S. Effect of «ice blockers» in solutions for vitrification of in vitro matured ovine oocytes. *Cryo Letters.* 2012;33(1):41-44.
10. Succu S, Berlinguer F, Leoni GG, Bebbere D, Satta V, Marco-Jimenez F, et al. Calcium concentration in vitrification medium affects the developmental competence of in vitro matured ovine oocytes. *Theriogenology.* 2011;75(4):715-721.
11. Byrd SR, Flores-Foxworth G, Applewhite AA, Westhusin ME. In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology.* 1997;47:857-864.
12. Abeydeera LR, Wang W, Pather RS, Day BN. Maturation in vitro of pig oocytes in protein-free culture media: Fertilization and subsequent embryo development in vitro. *Biol Reprod.* 1998;58:1316-1320.
13. Wang W, Niwa K. Synergetic effects of epidermal growth factor and gonadotropins on the cytoplasmic maturation of pig oocytes in a serum-free medium. *Zygote.* 1995;3:345-350.
14. Fernández RF, Hernández PJE, Castellanos GG. Viabilidad de ovocitos porcinos inmaduros y maduros in vitro vitrificados con etilén glicol y trehalosa. *Rev Salud Anim.* 2012;34(1):46-52.
15. Al-aghbari AM, Menino AR. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. *Anim Reprod Sci.* 2002;71:101-110.
16. Petters RM, Wells KD. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil.* 1993; 48 Suppl :S61-73.
17. Kochhar HPS, Wu B, Morris LHA, Buckrell BC, Pollard JW, Basur PK, et al. Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod Dom Anim.* 2002;37:19-25.
18. Stingfellow D, Seidel S. Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. 2da. Edición. Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones. Illinois, USA. 1990.

19. Fernández-Reyes F, Ducolomb Y, Romo S, Casas E, Salazar Z, Betancourt M. Viability, maturation and embryo development in vitro of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology*. 2012;64:261-266.
20. Kuehl RO. Diseño de Experimentos. Principios estadísticos para el diseño y análisis de Investigaciones. 2ª. México, D.F.: Thomson Learning; 2001.
21. Sanchez-Osorio J, Cuello C, Gill MA, Parrilla I, Maside C, Albiñana C, et al. Vitrification and warming of in vivo-derived porcine embryos in a chemically defined medium. *Theriogenology*. 2010;73(3):300-308.
22. Esaki R, Veda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, et al. Criopreservación de porcine embryos derived from in vitro-matures oocytes. *Biol Reprod*. 2004;71: 432-437.
23. Ushijima M, Yoshioka H, Esaki R, Takahashi K, Kuwayama M, Nakane T, et al. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. *J Reprod Dev*. 2004;50:481-486.
24. Nagashima H, Cameron RDA, Kuwayama M, Young M, Beebe L, Blackshaw AW, et al. Survival of porcine delipated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing or vitrification. *J Reprod Dev*. 1999;45:167-176.
25. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trenes in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocr*. 2002;187:77-81.
26. Zhu SE, Zeng SM, Yu WL, Li SJ, Zhang ZC, Chen YF. Vitrification of in vivo and in vitro produced ovine blastocysts. *Anim Biotechnol*. 2001;12(2):193-203.
27. Succu S, Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Leoni GG, et al. Vitrification of in vitro matured ovine oocytes affects in vitro pre-implantation development and mRNA abundance. *Mol Reprod Dev*. 2008;75(3):538-546.
28. Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA. Advances in swine in vitro embryo production Technologies. *Reprod Dom Anim*. 2010;45:40-48.
29. Nagashima H, Hiruma K, Saito H, Tomii R, Ueno S, Nakayama N, et al. Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biol Reprod*. 2007;76:900-905.
30. Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*. 2011;141:1-19.
31. Bettencourt EM, Bettencourt CM, Silva JN, Ferreira P, de Matos CP, Oliveira E, et al. Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved in vivo produced ovine embryos. *Theriogenology*. 2009;71(6):947-958.
32. Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vázquez JM, Roca J, et al. In vitro development following one-step dilution of OPS-vitrified porcine blastocysts. *Theriogenology*. 2004;62:1144-1152.

Recibido: 14-1-2012.

Aceptado: 19-12-2012.