

Embriología

## **Criopreservación de ovocitos humanos. Vitrificación vs. Congelación**

### *Human oocyte cryopreservation. Vitrification vs. Freezing*

Molina I<sup>1</sup>, Cervera R.P<sup>2</sup>, Duque C.C<sup>1</sup>, Alfonso J<sup>1</sup>, Romeu A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Reproducción Humana Asistida (Servicio de Ginecología y Obstetricia) Hospital Universitario La Fe, Valencia, <sup>2</sup>Laboratorio de Reproducción y Biotecnología Animal. Universidad Politécnica de Valencia, Unidad de Reproducción Humana Asistida (Servicio de Ginecología y Obstetricia) Hospital Universitario La Fe, Valencia. España.

#### **Resumen**

*La criopreservación de ovocitos presenta notables aplicaciones clínicas en los laboratorios de Reproducción Asistida. El objetivo de esta revisión es comparar los procedimientos de congelación lenta con los de vitrificación.*

*Los parámetros que determinan el éxito del proceso de criopreservación son entre otros la forma en que las células alcanzan el equilibrio osmótico en respuesta tanto a la adición de crioprotectores como durante el enfriamiento y la tasa o velocidad de enfriamiento. Los protocolos de congelación lenta dan lugar a la formación de cristales de hielo durante las fases de enfriamiento y calentamiento. La vitrificación combina tasas de enfriamiento ultrarrápidas con elevadas concentraciones de crioprotectores que impiden la formación de cristales de hielo. Los problemas técnicos más importantes de la vitrificación son conseguir tasas más rápidas de enfriamiento y determinar la máxima concentración posible de crioprotector que no resulte tóxica para la célula. Aunque la supervivencia tras la descongelación depende del tipo celular, cronobiología y calidad de los embriones transferidos, cada vez es mayor la eficacia alcanzada con las técnicas de vitrificación. El número de gestaciones y nacidos vivos obtenidos tras la transferencia de ovocitos y embriones congelados y vitrificados apuntan a que la vitrificación es un procedimiento más simple, rápido y seguro que la congelación convencional. Las ventajas de esta técnica la convierten en el método de elección para la criopreservación clínica tanto de ovocitos como de embriones en distintos estadios de desarrollo.*

**Palabras clave:** Criopreservación. Ovocito. Vitrificación. Congelación.

#### **Summary**

*Human oocyte cryopreservation has become an essential technique in Assisted Reproduction laboratories. The clinical applications of this technology should ensure optimal survival of the embryos and*

---

**Correspondencia:** Inmaculada Molina, PhD.  
Hospital Universitario La Fe (Unidad de Reproducción Humana Asistida),  
Av/ Campanar, 21  
46009, Valencia. España.  
e-mail: mimimaculala58@hotmail.com

*oocytes that are stored and subsequently thawed for transfer. The aim of this review is to compare the slow cooling procedures with vitrification.*

*The two most important parameters which determine the success of the cryopreservation procedure are the way that cells reach the osmotic equilibrium and the cooling rate. Slow-rate freezing protocols result in ice crystal formation during cooling and warming. Vitrification combines ultra-rapid cooling rates with high cryoprotectant concentrations that completely eliminate ice formation during cooling and warming procedures. The most important drawbacks of this technique are the need to achieve more rapid cooling rates and to determine the maximum cryoprotectant non toxic concentration for the cell. Although survival rate after thawing depends on cell type, chronobiology and embryo transfer quality, the success of the vitrification technique can be observed. The number of pregnancies and healthy births after cryopreserved oocyte transfer shows that vitrification is a simple, fast and safer procedure and that it could be the technique of choice for clinical cryopreservation.*

**Key words:** Cryopreservation. Oocyte. Vitrification. Freezing.

## INTRODUCCIÓN

La criopreservación de ovocitos humanos supone una serie de ventajas en Reproducción Asistida. Por un lado, resulta una de las pocas opciones que permiten la reproducción en aquellas pacientes que van a perder la función gonadal, bien por quimioterapia, radioterapia o por extirpación. De otro lado, permitiría prolongar la vida reproductiva de aquellas mujeres que, dada la tendencia social actual, retrasan hasta edades avanzadas la maternidad (1). Además, con la aplicación de la nueva Ley de Reproducción Asistida en España, que limita (en principio) a tan sólo tres los ovocitos a fecundar por ciclo de estimulación, un número variable pero relativamente elevado de ovocitos deberán ser criopreservados.

La obtención de embriones viables a partir de ovocitos criopreservados ha resultado ser una tarea difícil e ineficiente en cualquier especie animal, en primer lugar por los daños producidos en los propios ovocitos que reducen considerablemente la tasa de supervivencia (entre 50 y 60%) (2-4) y, en segundo, por las anomalías que se presentan durante y tras la fecundación in vitro (FIV) convencional.

## CONGELACIÓN DE OVOCITOS

Los primeros nacimientos obtenidos tras la criopreservación de oocitos humanos se obtuvieron tras la aplicación de un protocolo de congelación similar al aplicado para la criopreservación de oocitos de ratón, basado en la adición de dimetilsulfóxido (DMSO 1.5M; 5). Las tasas de supervivencia (74%) y de fecundación (75%) tras la congelación-descongelación fueron elevadas. Sin embargo, y pese a aplicar los

mismos o semejantes protocolos de criopreservación, los resultados obtenidos posteriormente fueron considerablemente inferiores. De hecho, las tasas de supervivencia fueron de tan sólo el 22-27% (6, 7), las tasas de fecundación del 58% (7) y sólo en algunos casos se obtuvieron nacidos vivos (6).

Más tarde se consiguió mejorar la tasa de supervivencia tras la sustitución del DMSO por el 1,2-propandiol (PROH) (8, 9), y se obtuvieron nacidos vivos tras la criopreservación utilizando este crioprotector, pese a que la tasa de poliploidías registrada fue muy elevada.

La principal causa que determina la baja supervivencia de los oocitos tras la congelación-descongelación es la formación intracelular de cristales de hielo que rompen las membranas celulares provocando la lisis celular. Siendo que los oocitos humanos contienen una elevada cantidad de agua intracelular, se requiere de una adecuada deshidratación previamente a la reducción de la temperatura. La formación de cristales de hielo se ve reducida por la presencia de crioprotectores en la solución de criopreservación, por el periodo de exposición a los mismos así como por la velocidad de congelación y de calentamiento (10). El PROH y el DMSO actúan como crioprotectores permeables, pero la deshidratación previa del oocito sólo se logra por la adición de sacarosa u otros azúcares no permeables, al medio de congelación (11), dada su naturaleza de crioprotector no permeable.

El aumento en la concentración de sacarosa en la solución de criopreservación así como el tiempo de exposición a la misma favorece la deshidratación y por tanto evita la formación de cristales de hielo (12). La elevada concentración de solutos utilizada así como el tiempo de exposición prolongado a los mismos puede resultar dañino para los oocitos (13). Así pues,

en los procedimientos de congelación se persigue alcanzar un equilibrio entre estos factores (toxicidad, formación de cristales de hielo y cambios osmóticos).

Los daños provocados sobre los oocitos criopreservados, tales como la desestabilización de la placa metafásica en la unión de los cromosomas a los microfilamentos previa a la expulsión del segundo corpúsculo polar (14-19), la alteración de la migración de los pronúcleos y de la citocinesis (20), los daños en la zona pelúcida (9, 21, 22) y la liberación prematura de los gránulos corticales (19, 20, 23, 24), son los responsables de la baja tasa de supervivencia oocitaria registrada, tanto en los primeros protocolos de congelación aplicados, como en los más recientes.

Las alteraciones observadas en la placa metafásica se recuperan tras incubar los oocitos a 37° C durante un periodo de tiempo suficiente (25-27). Sin embargo, los daños sobre la zona pelúcida así como la liberación prematura de los gránulos corticales son irreversibles y determinan en gran medida las bajas tasas de fecundación obtenidas por FIV (20). Es por ello que mediante la eliminación de la zona pelúcida (28) o su perforación (29), se consigue mejorar la tasa de fecundación, aunque no en los casos en que la expulsión de los gránulos corticales ya se había producido.

Los anteriores problemas que afectaban al resultado de la fecundación in vitro convencional se resolvieron finalmente por la aplicación de la ICSI. De hecho las tasas de fecundación y de división obtenidas tras la fecundación por ICSI de oocitos criopreservados fue superior a la obtenida por fecundación convencional (2, 3). En 1997, Porcu y cols., (30) obtuvieron el primer nacimiento de individuos vivos tras la criopreservación de oocitos humanos y su posterior fecundación por ICSI, pese a las bajas tasas de supervivencia (33%) y de fecundación (50%) obtenidas. Tales resultados fueron posteriormente mejorados, de hecho Fabbri et al. (2001) obtuvieron una tasa de fecundación del 58%, de división del 91% de los que el 74% fueron clasificados como de buena calidad, tras ICSI sobre oocitos criopreservados.

Estos resultados indican que, al menos en la especie humana, la aplicación de la ICSI permite obviar muchos de los problemas que genera la congelación de oocitos (31-33). Aún así, las tasas de nacidos (respecto a los oocitos congelados) logradas con los procedimientos de congelación lenta convencionales siguen siendo muy bajas (<1%-2%) (34-36), excepto cuando se utilizan ovocitos de donante (6-10%) (37).

En los pocos estudios publicados en los que se ha

**Tabla 1**

*Resultados obtenidos tras la fecundación por ICSI de ovocitos humanos congelados.*

*1 Utilizan ovocitos MII de donante.*

*2 Utilizan ovocitos MII envejecidos de paciente (1) y de donante (2).*

*3 Evaluada sobre los ovocitos congelados.*

*SV: Supervivencia. TF: Tasa de fecundación. SM: Segmentación. BL: Blastocisto in vitro. NV: nacidos vivos.*

Autores	Protocolo congelación descongelación	SV	TF	SM	BL	NV3
Gook y cols., 1995 (2)	Lenta (1,2-propanediol)-rápida	-	50%	100%	29-53%	-
Tucker y cols., 19962 (32)	Lenta (1,2-propanediol y sacarosa)	1) 55% 2) 25%	1) 41% 2) 65%	-	-	2) 0%
Porcu y cols., 1997 (30)	Lenta-rápida	33%	50%	50%	-	25%
Tucker y cols., 1998 (34)	Lenta-rápida	-	67%	-	-	<1%
Fabbri y cols., 1998 (4)	Lenta (1,2-propanediol y sacarosa)-rápida	60%	-	-	-	-
Porcu y cols., 1998 (35)	Lenta-rápida	56%	63%	90%	-	<1%
Porcu y cols., 1999 (85)	Lenta- rápida	54%	57%	91%	-	<1%
Fabbri y cols., 2001 (12)	Lenta (1,2-propanediol y sacarosa)-rápida	53-82%	57% of thawed	91%	-	-
Quintans y cols., 2002 (36)	Lenta-rápida	63%	59%	-	-	-
Fosas y cols., 20031 (37)	Lenta (1,2-propanediol y sacarosa)-rápida	90%	73%	-	-	6%
Wu y cols., 2001 (38)	Ultrarrápida	59%	-	-	5%	-

utilizado la congelación ultrarrápida, basada en la utilización de elevadas concentraciones de crioprotectores y la inmersión directa en nitrógeno líquido, esta técnica no ha supuesto mejora alguna en los resultados, tanto en humana como en el resto de animales domésticos. En el caso de ovocitos humanos inmaduros, se han logrado tasas de supervivencia de tan sólo el 59% y desarrollo a blastocisto del 5% (38).

El estadio madurativo más adecuado para la criopreservación sería el de ovocito preovulatorio metafase II. Hwu y cols., (39) demostraron que aunque el material nuclear del ovocito estaría más protegido en estadio de profase I, el cultivo *in vitro* posterior disminuiría considerablemente la eficiencia reproductiva. Por otra parte, las células de la granulosa no ejercen un efecto protector en el proceso de criopreservación ya que dificultan la difusión de los crioprotectores al interior del ovocito. La criopreservación de ovocitos metafase II decumulados presenta unos resultados superiores a los de la criopreservación de ovocitos con cúmulo (34, 40).

Gook y cols., (41) observaron que los ovocitos que se criopreservaban con tasas de enfriamiento rápidas mantienen la integridad de los gránulos corticales y del uso mitótico. Se realizaron cariotipos de embriones procedentes de ovocitos criopreservados observándose que el porcentaje de anomalías cromosómicas era similar al de los ovocitos no criopreservados y que los ovocitos humanos criopreservados pueden fecundarse normalmente y cultivarse hasta el estadio de blastocisto en expansión (42).

En cuanto a la eficiencia reproductiva, Boldt y cols., (43) obtienen porcentajes de gestación con criopreservación de ovocitos similares a los obtenidos para embriones congelados. Estos mismos autores indican que el porcentaje de degeneración ovocitaria tras la microinyección de ovocitos criopreservados disminuye cuando los ovocitos se incuban un mínimo de 3 horas. Este tiempo de incubación podría estar relacionado con el tiempo necesario para que el uso mitótico se establezca tras la descongelación.

## VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS

Aunque la mayoría de embarazos a término se han obtenido a partir de oocitos criopreservados por procedimientos de congelación lenta, ya que sólo recientemente se ha ensayado la vitrificación de oocitos, los resultados obtenidos hasta ahora con ésta nueva técnica indican que puede utilizarse con éxito (obtención de nacidos vivos) para la criopreservación de ovocitos tanto animales (44,45) como humanos (1, 46).

La vitrificación es un procedimiento de criopreservación caracterizado por la elevada concentración de crioprotectores y la elevada velocidad de enfriamiento, que evita la formación de cristales de hielo intracelulares.

Ya en 1985, se vitrificaron embriones de ratón (47), cuyo éxito se demostró ocho años más tarde (48). En 1996, Martino y cols., (49) demostraron que los ovocitos de vacuno vitrificados eran capaces de desarrollarse hasta el estadio de blastocisto. En 1997, se vitrificaron con éxito embriones tempranos de vacuno (45). En el ámbito de la Reproducción Asistida, en 1999 y 2000 se obtuvieron gestaciones y nacimientos a término tras la vitrificación de oocitos humanos (46, 50, 51). A partir de este momento, el número de publicaciones referidas a la vitrificación de oocitos y embriones humanos no ha dejado de crecer.

La solución de vitrificación inicialmente utilizada para la vitrificación de embriones de ratón (47) resultaba excesivamente tóxica. Para reducir este problema, dichos autores preequilibraron los embriones a 4° C someténdolos a una secuencia de soluciones de crioprotectores de concentraciones crecientes antes de ser sumergidos en nitrógeno líquido, proceso que duraba unos 50-60 minutos (47, 52).

Las elevadas concentraciones de crioprotectores (47, 53, 54) también suponían fuertes choques osmóticos, si su adición y su dilución se realizaban en un solo paso. Se convirtió pues en una necesidad la formulación de soluciones de vitrificación menos tóxicas (48, 55, 56), contrarrestando los efectos de las elevadas concentraciones de crioprotectores por la adición de sustancias no permeables (56-61), la reducción del tiempo de exposición a los crioprotectores, o su concentración final. También se ha ensayado la utilización de soportes que permitan la vitrificación en microvolúmenes, con lo que se incrementa la velocidad de enfriamiento del material biológico (Electromicroscope Grids, Cryoloops, Open Pulled Straws, Closed Pulled Straws, Hemi-straws) y que, en ciertos casos, incluso permiten reducir la concentración de crioprotectores. En estos sistemas, el contacto directo de las muestras con el nitrógeno líquido las expone a posibles contaminaciones víricas (62). Para evitarlo se utilizan para su almacenamiento crioviales que aíslan los ovocitos del resto de muestras, o bien se sellan antes de introducirlas en el banco (Closed Pulled Straws). Tales modificaciones han permitido la vitrificación con éxito de embriones y de oocitos tanto humanos (46, 51, 55, 63-68) como de especies domésticas (57, 59, 60, 69, 70-74).

Con la aplicación de distintos protocolos de vitrificación de ovocitos de animales domésticos, se han

logrado tasas de supervivencia más uniformes (55-99%) que las obtenidas tras la congelación (ver tablas 2 y 3) y, tasas de nacidos vivos tras FIV (<1%-25%) superiores a las obtenidas por congelación (ver tablas 2 y 3). Tales resultados han conducido a la aplicación de tales protocolos (o similares) sobre ovocitos humanos (ver tabla 4). Es más, las tasas de nacidos (respecto a las de vitrificados) obtenidas con ovocitos de pacientes (2-6%), aunque todavía inferiores a las obtenidas con ovocitos de animales domésticos (<1%-25%; ver tabla 3), son superiores a las obtenidas en humana por congelación lenta de este tipo de ovoci-

tos (<1%-2%), y próximas a las de congelación de ovocitos de donante (6-10%) (37).

### ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS DETERMINADAS POR LA CRIOPRESERVACIÓN.

En general las alteraciones más importantes determinadas por la criopreservación de ovocitos humanos son la baja eficiencia reproductiva y el riesgo de aneuploidias. La baja eficiencia reproductiva viene determinada por bajos porcentajes

**Tabla 2**

*Resultados de congelación de ovocitos de animales domésticos.*

*\*Evaluado sobre divididos.*

*1 Sobre congelados.*

*SV: Supervivencia. TF: Tasa de fecundación. SM: Segmentación. BL: Blastocisto in vitro. NV: nacidos vivos.*

Autores	Especie	Protocolo congelación	SV	TF	SM	BL	NV1
Al-Hasani y cols., 1986 (86)	Conejo-MI	Lenta	5-29%	FIV	-	-	-
Chuong y Coulam, 1986 (87)	Hamster-MII	Lenta	52-64%	75%	-	-	<1%
Al-Hasani y cols., 1989 (88)	Conejo-MII	Lenta	32%	FIV: 74%	-	-	18% imp. 2% nacidos
Carroll y cols., 1989 (89)	Ratón-MII	Lenta	-	FIV: 63%	46%	75%	-
Carroll y cols., 1990 (29)	Ratón-MII	Lenta	-	49%	-	-	-
Nakagata, 1990 (90)	Rata-MII	Lenta	65%	IA: 61%	30%	19 (M+B)	-
Schroeder y cols., 1990 (91)	Ratón-MII/GV	Lenta	MII: 84% GV:69%	IA	MII: 17% GV: 9%	MII: 18% GV: 0%	-
Tobback y cols., 1991 (92)	Hamster-mMII	Lenta	94%	-	-	-	-
Karlsson y cols., 1996 (93)	Ratón-MII	Lenta	82%	-	65%	50%	-
Frydman y cols., 1997 (94)	Ratón-GV	Lenta	90%	-	-	-	-
Kubota y cols., 1998 (95)	VacunoMII/GV	Lenta	47-84%	FIV	58-60%	-	-
Lim y cols., 1999 (96)	Vacuno-MII	Lenta	62-86%	-	33-54%	-	-
Asada y Fukui, 2000 (97)	Vacuno-GV	Lenta	-	-	16-23%	4%	-
Luvoni y Pellizzari, 2000 (98)	Gato-MII/GV	Lenta	-	-	MII: 39% GV: 7%	-	-
Stachecki y cols., 2000 (99)	Ratón-MII	Lenta	99-100%	FIV	-	46-60%	-
Stachecki y cols., 2002 (100)	Ratón-MII	Lenta	98%	FIV	-	84%	73% imp. 48% fet. 14% nacidos
Nakagata, 1990 (90)	Ratón-MII	Rápida	77-91%	FIV	71-83%	-	31-43%*
Lewin y cols., 1990 (101)	Hamster-MII	Rápida	82%	-	-	-	-
Van der Elst y cols., 1993 (102)	Ratón-GV	Rápida	78%	-	-	-	-
Van der Elst y cols., 1993 (102)	Ratón-MII	Rápida	78%	IA	59%	44%	-
Isachenko y Nayudu, 1999 (103)	Ratón-GV	Rápida	>80%	-	-	-	-

**Tabla 3***Resultados de la vitrificación de ovocitos de animales domésticos.**SV: Supervivencia. TF: Tasa de fecundación. SM: Segmentación. BL: Blastocisto in vitro. NV: nacidos vivos*

Autores	Especie	Protocolo vitrificación	Soporte	Dilución	SV	TF	SM	BL	NV
Kono y cols 1991 (104)	Ratón-MII	-	-	1) Glicerol+ sacarosa 2) Sacarosa	1) 83% 2) 75%	FIV: 80-87%	-	69-78%	25%
Shaw y cols 1991 (105)	Ratón-MII	-	-	-	-	-	-	55%	-
Shaw y cols 1992 (106)	Ratón-MII	-	-	-	-	-	-	32%	-
Arav, 1993 (107)	Vacuno-VG	40% PEG+ 0.25M trehalosa+ 4% BSA	-	-	-	37%	-	-	-
Fuku y cols 1995 (108)	Vacuno-MII/VG	2M DMSO+ 1M acetamida+ 3M propanediol+ 10% FC (<20'')	-	1 paso/3 pasos	-	-	MII5 7%	0% GV:0%	-
Bos-Mikich y cols 1995 (109)	Ratón-MII	6M DMSO	-	-	-	PA/FIV: 85%	-	-	68-80% imp 38-49% fet
Hochi y cols 1996 (74)	Caballo-VG	1paso/2pasos 1) 20% EG (10/20') VS: 40% EG+18% Ficoll+ 0.3M sacarosa)	-	-	-	-	-	-	-
O'Neil y cols 1997 (110)	Ratón-MII	Varios pasos - VS: 6M DMSO+ 1 mg/ml PEG/sin PEG	pajuela	1M sacarosa	60-95%	80-91%	-	73-55%	-
Vatja y cols 1998 (45)	Vacuno-MII	-	OPS	-	-	-	-	25%	-
Otoi y cols 1998 (44)	Vacuno-MII	A) 1 paso/3 pasos VS: 30% EG+0.35M sacarosa B) VS: 20/30/40/50%3) EG+ 0.35M sacarosa	pajuela 2)	1) 0,5M sac 1/5/10 min B)	A) 3 pasos> 1 paso 40/50% >20/30%	-	A) 3 pasos >1 paso sac	40%EG y 5 0,5M 10%	-
Bautista y cols 1998 (111)	Ratón-MII	1 paso/2 pasos VS: 7M EG	-	5/10:1M sacarosa	-	-	-	-	-
Dhali y cols 2000 (112)	Búfalo-VG	1) 2.25M EG+1.7M DMSO+ 2.78M sacarosa+0.165M piruvato sódico+ 0.2% BSA (1/3') 2) 4.5M EG+3.4M DMSO+ 5.56M sacarosa+0.33M piruvato sódico+ 0.4% BSA 4) 2' en vapor de nitrógeno	pajuela	0,5M savarosa (5)	1:85% 2:98%	-	-	-	-
Lane y cols 1999 (65)	Vacuno	-	-	-	-	-	-	41%	-

**Tabla 3**  
*Continuación*

Dinnyés y cols 2000 (113)	Vacuno-MII	1) 4% EG-20%FBS (12-15') 39°C 2) 35% EG+5% PVP+ 0.4M trehalose-20%FBS (25-30'')	SSV	0.3M trealosa (3') 39°C FIV:81- 85%	79-85% 86% FIV:58- 62%	PA:79% 63 %	PA:52- FIV: 15	PA:8%	-
Lane y Gardner 2001 (114)	Ratón-MII	-	Nylon	-	-	70%	-	67%	88% imp 57%fet
Park y cols 2001 (115)	Ratón-MII	1) 1.5MEG-10% FBS (2.5') 2) 5.5MEG+1.0M sacarosa-10% FBS+ taxol (20'')	EG	1.0, 0.5, 0.25, 0.125 M sacarosa (2.5')	89%	FIV:78	84%	59%	-
De la Peña y cols 2001 (116)	Ratón-MII	1) 2MEG (2.5')/ 0.15-0.3M rafinosa (5-5') (10) -91% 2) 6MEG+0.3M raffinose- 10% FCS (0.5')/(0.5-2')	pajuela	1M savarosa	91%/87 -86%	FIV -75%	84%/8370%73	-	-
Matsumoto y cols 2001 (117)	Vacuno-VG	1) 40% EG+ 18% Ficoll+ 0.3 M sacarosa (30-50'')	Nylon	0,5M (1) mesh EG	94-97% 0,25M (1) 0,125M (1) sacarosa	FIV EG:84	10-13% 13%	0% EG:7%	-
Mavrides y Morrol 2002 (118)	Vacuno-MII	-	cryoloop	-	91%	ICSI	16%	-	-
MacLellan y cols 2002 (119)	Caballo-MII	1) 5% DMSO+5% EG (30'') 2) 10% DMSO+10% EG (30'') 3) 20% DMSO+20%EG+ 10 mg/ml ficoll+0.65M	Nylon cryoloop p(0,5- 0,7mm)	0,25,0,188 0,125M sacarosa (38°C) (30)	73%	IA	-	12% vesículas emb a día 16	8% de gest.
Vieira y cols 2002 (120)	Vacuno-VG	1) 10% EG+10% DMSO+ 20% EMS (30'') 20% EG + 20% DMSO+ 0.5 M sacarosa+20%EMS (25'')	OPS	0,26 M 0,16 M sacarosa (5)	99% sacarosa (5)	FIV	46-49%	4-6%	<1%
Begin y cols 2003 (121)	Caprino-MII	1) TCM-199H-20%GS 2) 4% EG (12-15') 34°C 3) 35% EG+5% PVP+0.4 trehalose 34°C (30'') 1) TCM-199H-20%GS 2) 10% EG+10% DMSO (2-3') 34°C 3) 20%EG+20%DMSO+ 0.65 M sacarosa (45'')	SSV Cryoloop	0,3 trealosa 3 0,25 M sacarosa 2-5 0,125 M sacarosa	77% 92% 38,5°C 38,5°C	PA PA	57% 58%	0% 0%	- -

de supervivencia, fecundación y desarrollo embrionario (75). Las alteraciones cromosómicas tras la descongelación se deberían a aneuploidías por no disyunción de los cromosomas y/o separación prematura de las cromátides (37, 75, 76). Los cromosomas más implicados en estas aneuploidías serían: 15, 18, 19, 22, 21 y X (77-79).

En la mayor parte de las especies animales el daño mecánico producido por los cristales de hielo disminuye la supervivencia y la capacidad de desarrollo posterior del ovocito (49, 80-82). El enfriamiento de ovocitos MII resulta en una despolimerización del huso meiótico en el ratón (14, 25), vacuno (83) y humano (17, 84), aunque la intensidad del daño celular

**Tabla 4**

Resultados de la vitrificación de ovocitos humanos.

SV: Supervivencia. TF: Tasa de fecundación. SM: Segmentación. BL: Blastocisto in vitro. NV: nacidos vivos.

Autores	Protocolo vitrificación	Soporte	Dilución	SV	TF	SM	BL	NV
Hong y col 1999 (122)	1) 1.5M EG (5') 2) 5.5M EG + 1.0M sacarosa (20'')	EG	1.0M, 0.5M, 0.25M y 0.125 M sacarosa (2.5')	86%	71%	93%	36%	-
Kuleshova y col 1999 (46)	1) 1.8M EG + 10mg/ml HSA (40'') 2) 3.6M EG + 10 mg/ml HAS (30'') 3) 7.2M EG + 0.6 M sacarosa + 10mg/ml HAS (60'')	OPS		65%	-	-	-	6%
Chen y col 2000 (123)	1) 1.5M EG (5') 2) 5.5M EG + 1.0M sacarosa (60'')	Straws	1.0M, 0.5M, 0.25M y 0.125 M sacarosa (2.5')	94%	59%	80%	0	-
Yoon y col 2003 (51)	1) 1.5M EG + 10%FBS (2.5') 2) 5.5M EG + 1.0M sacarosa + 10%FBS (20'')	EG	1.0M, 0.5M, 0.25M y M sacarosa, (2,5)	69%	72%	-	-	2%
Liebermann y Tucker, 2002 (13)	1) PBS-20% SSS T <sup>a</sup> amb. 10' 2) 10% EG+10% DMSO+ 1mg PEG (60'') 3) 20% EG+20% DMSO+1mg PEG + 10 mg Ficoll (20'')	H-S Cryoloop	-	85% 81%	-	-	-	-
Liebermann y col 2003 (124)	a) 3.6M EG + 2.8M DMSO + 0.4M sacarosa + 20% synthetic serum substrate. b) 3.6M EG + 2.8M DMSO + 0.65M sacarosa + 1% PEG + 10% Ficoll + 20% synthetic serum substrate	Cryoloop	-	81%	-	-	-	-

varía según las especies. Se ha demostrado también en ratón y conejo que algunos crioprotectores (DMSO) alteran la organización de los microtúbulos (82).

Las alteraciones del huso meiótico de los ovocitos de ratón pueden ser reversibles tras incubación a 37° C (14, 25), pero se han observado daños irreversibles en ovocitos humanos y bovinos (17, 83). Este daño se manifiesta en dispersiones de los cromosomas que resultan en anomalías cromosómicas tras la fecundación tales como aneuploidias y poliploidias (17, 83).

Los ovocitos humanos son menos sensibles que los bovinos a los daños por chilling (daños en sistemas enzimáticos que se producen por enfriamiento a temperaturas sobre cero), ya que la despolimerización del huso que ocasiona (entre otros efectos), ocurre después de que hayan sido enfriados a 0° C durante 3-4 minutos (84). En el ganado vacuno esta despolimerización ocurre cuando se enfrían a 4° C solamente un minuto (83).

## CONCLUSIONES

La vitrificación es una técnica de criopreservación que permite eliminar completamente los cristales de

hielo intracelular, lo que determina que la mayor parte de las células mantengan su integridad. Esta baja tasa de lisis celular se traduce en un aumento brusco de las tasas de supervivencia y desarrollo in vitro.

Se trata también de una técnica rápida, segura, eficaz y menos costosa, con una gran versatilidad que permite modificar tanto el número de pasos de adición de crioprotector como la concentración de crioprotector, el tiempo de exposición y los contenedores empleados.

Los elevados porcentajes de supervivencia obtenidos en ovocitos humanos vitrificados, unido a las elevadas tasas de fecundación y desarrollo in vitro hasta el estadio de blastocisto, y en definitiva, los cada vez mejores resultados en términos de nacidos vivos sanos hacen de la vitrificación la técnica de elección para la criopreservación de ovocitos humanos.

## AGRADECIMIENTOS

A F. García-Ximenez, Director del LARB-UPV, por descubrirnos la técnica de vitrificación, aclararnos las dudas y enseñarnos a utilizarla.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, Cha KY.:** Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril*, 2003; 79 (6): 1323-6.
2. **Gook D, Schiwe MC, Osborn S, Asch RH, Jansen RP, Johnston WI.:** Intracytoplasmic sperm injection and embryo development using 1,2-propanediol. *Hum Reprod*, 1995; 10: 2637-41.
3. **Kazem R, Thompson L, Srikantharajah A, Laing MA, Hamilton MP, Templeton A.:** Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1995; 10: 2650-4.
4. **Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Venturoli S, Flamigni C.:** Oocyte cryopreservation. *Hum Reprod*, 1998; 13 (Suppl. 4): 98-108.
5. **Chen C.:** Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, 1986; 1 (8486): 884-6.
6. **Van Uem J.F, Siebzehnrubl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N.:** Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet*, 1987; 1 (8535) 752-753.
7. **Diedrich K, Al-Hasani S, Van den Ven H.:** Successful in vitro fertilization of frozen-thawed rabbit and human oocytes (abstract). In: Proceedings of the 5th World Congress of IVF and ET, Seattle, 1987; 562-570.
8. **Al-Hasani S, Diedrich K, Van den Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D.:** Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod*, 1987; 2: 695-700.
9. **Todorow S, Seibzehnrubl E, Spitzer M, Koch R, Wildt L, Lang N.:** Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze-thaw regimens II: human. *Hum Reprod*, 1989; 4: 812-816.
10. **Shaw JM.:** Cryopreservation of oocytes and embryos. In: Trounson, A.; Gardner, D. eds. *Handbook of in vitro fertilization*. Boca Raton: CRC Press, 1993; 288-302.
11. **Friedler S, Giudice L, Lamb E.:** Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril*, 1988; 49: 743-64.
12. **Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C.:** Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Human Reprod*, 2001; 16:411-416.
13. **Liebermann J, Tucker MJ.:** Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction* 2002; 124:483-489.
14. **Magistrini M, Szollosi D.:** Effects of cold and of isopropyl N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes. *Eur J Cell Biol*, 1980; 22: 699-707.
15. **Sathananthan AH, Ng SC, Trounson A, Bongso A, Ratnam SS, Ho J, Lee MN.:** The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res* 1988; 21:385-401.
16. **Sathananthan AH, Trounson A, Freeman L, Brady T.:** The effects of cooling human oocytes. *Hum Reprod* 1988; 8:968-77.
17. **Pickering S, Braude P, Johnson M, Cant A, Currie J.:** Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril*, 1990; 54: 102-8.
18. **Van der Elst J, Van der Abeel E, Nerinckx S, Van Steirteghem A.:** Parthenogenetic activation of pattern and microtubular organization of the mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. *Cryobiology*, 1992; 29: 549-62.
19. **Gook D, Osborn S, Johnson W.:** Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *J In Vitro Fert Assist Reprod*, 1988; 541: 550-61.
20. **Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH.:** The zona hardening effect of dimethyl sulfoxide requires the presence of an oocyte and is associated with reduction in the number of cortical granules present. *J Reprod Fertil*, 1990; 89: 253-9.
21. **Johnson MH, Pickering SJ, George MA.:** The influence of cooling on the properties of the zona pellucida in mouse oocytes. *Hum Reprod*, 1988; 3: 383-87.
22. **Johnson MH.:** The effect on fertilization of exposure of mouse oocytes to dimethyl sulfoxide: an optimal protocol. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1989; 6: 168-75.
23. **Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD.:** Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryoprotectants. *Biol Reprod*, 1989; 40: 379-93.
24. **Al-Hasani S, Diedrich K.:** Oocyte storage. In: Grudzinskas, J.G.; Yovich, J.L. eds. *Gametes/The oocyte*. Cambridge: Cambridge University Press, 1995; 401-19.
25. **Pickering SJ, Johnson MH.:** The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod*, 1987; 2: 207-16.
26. **Sathananthan AH, Kirby C, Trounson A, Philipatos D, Shaw J.:** The effects of cooling mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet*, 1992; 9: 139-48.
27. **Almeida PA, Bolton VN.:** The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote*, 1995; 3: 357-65.
28. **Wood MJ, Whittingham DG, Sang-Ho L.:** Fertilization failure of frozen mouse oocytes is not due

- to premature cortical granule release. *Biol Reprod*, 1992; 46: 1187-95.
29. **Carroll J, Depypere H, Matthews CD.**: Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil*. 1990 Nov; 90(2):547-53.
  30. **Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R, Ciotti PM, Magrini O, Flamigni C.**: Birth of a healthy female after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Fertil Steril*, 1997; 68:724-730.
  31. **Toth T.L, Lanzendorf SE, Sandow BA, Veeck LL, Hassen WA, Hansen K, Hodgen GD.**: Cryopreservation of human prophase I oocytes collected from unstimulated follicles. *Fertil Steril*, 1994; 61 (6): 1077-1082.
  32. **Tucker M, Wright G, Morton P, Shanguo L, Massey J, Kort H.**: Preliminary experience with human oocyte cryopreservation using 1, 2 propanediol and sucrose. *Human Reprod.*, 1996; 11:1513-1515.
  33. **Park SE, Son W.Y, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY.**: Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured in vitro after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil Steril*. 1997 Nov; 68(5):920-926.
  34. **Tucker M, Wright G, Morton P, Massey JB.**: Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent in vitro maturation. *Fertil Steril*, 1998; 70:578-579.
  35. **Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R.**: Birth of six healthy children after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved human oocytes. *Hum. Reprod.*, 1998; 13 (Abstract Book: 124).
  36. **Quintans CJ, Donaldson MJ, Bertolino MV, Pasqualini RS.**: Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium. *Human Reprod*, 2002; 17 (12): 3149-3152.
  37. **Fosas N, Marina F, Torres PJ, Jove I, Martin P, Perez N, Arnedo N, Marina S.**: The births of five Spanish babies from cryopreserved donated oocytes. *Human Reprod*, 2003; 18 (7): 1417-1421.
  38. **Wu J, Zhang L, Wang X.**: In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction*, 2001; 121 (3): 389-393.
  39. **Hwu YM, Lee RKK, Su JT, Lin MW.**: Lin, S.P. Fertilization and embryonic development of cryopreserved human immature oocytes collected at time of Caesarean section following intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 1998; S110-S111.
  40. **Cha KY, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Han SY, Choi DH, Yoon TK.**: Freezing immature oocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 2000; 169: 43-47.
  41. **Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston WI.**: Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Human Reprod*, 1993; 8: 1101-1109.
  42. **Gook DA, Osborn SM, Bourne H, Johnston WI.**: Fertilization of human oocytes following cryopreservation: normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Human Reprod*, 1994; 9: 684-691.
  43. **Boldt J, Cline D, McLaughlin D.**: Human oocyte cryopreservation as an adjunct to IVF-embryo transfer cycles. *Human Reprod*, 2003; 6: 1250-1255.
  44. **Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T.**: Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology*, 1998; 37 (1): 77-85.
  45. **Vatja G, Holm P, Kuwayama M.**: Open pulled straw (ops) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryo *Mol Reprod Dev*, 1998; 51: 53-58.
  46. **Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A.**: Birth following vitrification of small number of human oocytes. *Human Reprod*, 1999; 14: 3077-3079.
  47. **Rall WF, Fahy G.M.**: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 1985; 313: 573-575.
  48. **Ali J, Shelton JN.**: Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil*, 1993; 99: 471-477.
  49. **Martino A, Songsasen N, Leibo SP.**: Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod*, 1996; 54: 1059-1069.
  50. **Chen SU, Lien YR, Chao KH, Lu HF, Ho HN, Yang YS.**: Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil Steril*, 1999; 74: 804-808.
  51. **Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SY, Ko JJ, Cha KY.**: Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertilisation-embryo transfer program. *Fertil Steril*, 2000; 74; 180-181.
  52. **Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham D.G.**: Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fertil*, 1987; 80: 499-504.
  53. **Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka J, Miki Y.**: Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, 1993; 40: 427-439.
  54. **Rall WF, Wood MJ.**: High in vitro and in vivo survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. *J Reprod Fertil*, 1994; 101: 681-688.
  55. **Mukaida T, Wada M, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M.**: Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod*, 1998; 13: 2874-2879.

56. **Kuleshova LL, Shaw JM, Trounson AO.:** Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, 2001; 43: 21-31.
57. **Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T.:** A Simple method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 91-97.
58. **Tada N, Sato M, Amann E, Ogawa S.:** A simple and rapid method for cryopreservation of mouse 2-cell embryos by vitrification -beneficial effect of sucrose and raffinose on their cryosurvival rate. *Theriogenology*, 1993; 40: 333-344.
59. **Saito N, Imai K, Tomizawa M.:** Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 1994; 41: 1053-1060.
60. **Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T.:** Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*, 1996; 33: 291-299.
61. **Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ, Ha SY, Choi DH, Cha KY.:** In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertil Steril*, 2000; 73: 545-551.
62. **Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T.:** Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 2000; 40:110-116.
63. **Ohta N, Nohara M, Kojimahara T et al.:** Ultrarapid freezing of human embryos by vitrification method. *Jpn J Fertil Steril*, 1996; 41: 276-279.
64. **Vanderwalmen P, Delval A, Chatrziparasideou A et al.:** Pregnancy after vitrification of human day 5 embryos (abstract O-198). *Hum Reprod*, 1997; 12 Suppl: 98.
65. **Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT.:** Container-less vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol*, 1999; 17: 1234-1236.
66. **Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK.:** Vitrification of mouse and human blastocysts using novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999; 72:1073-1077.
67. **Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asata T, Araki Y.:** Successful pregnancy following blastocysts vitrification. *Hum Reprod*, 2000; 15: 1802-1803.
68. **Yokota Y, Sato S, Yokota M, Yokota H, Araki Y.:** Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts. *Fertil Steril*, 2001; 75: 1027-1029.
69. **Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T, Machida T.:** High survival of rabbit morulae after vitrification in ethylene glycol-based solutions by a simple method. *Biol Reprod*, 1992; 46: 1042-1046.
70. **Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T, Kasai M.:** Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilisation. *Mol Reprod Dev*, 1993; 34: 266-271.
71. **Yoshino J, Kojima T, Shimizu M, Tomizuka T.:** Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. *Cryobiology*, 1993; 30: 413-422.
72. **Zhu SE, Kasai M, Otoe H, Sakurai T, Machida T.:** Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fertil* 1993; 98: 139-145.
73. **Titterington JL, Robinson SR, Hay DM.:** Synthetic and biological macromolecules: protection of mouse embryos during by vitrification. *Hum Reprod*, 1995; 10: 649-653.
74. **Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N.:** In vitro maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology* 1996; 33:300-310.
75. **Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY.:** Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing. *Mol Cell Endocrinol*, 2003; 202 (1-2): 101-7.
76. **Plachot M.:** Genetic análisis of the oocyte. *Placenta*, 2003; 24: S66-9.
77. **Honda N, Miharu N, Hara T, Samura O, Honda H, Ohama K.:** Chromosomal FISH análisis of unfertilized human oocytes and polar bodies. *J. Hum Genet.*, 2002; 47 (9): 488-91.
78. **Cupisti S, Conn CM, Fragouli E, Whalley K, Mills JA, Faed MJ, Delhanty JD.:** Sequential FISH analysis of oocytes and polar bodies reveals aneuploidy mechanisms. *Prenat Diagn*, 2003; 23: 663-8.
79. **Clyde JM, Hogg JE, Rutherford AJ, Picton HM.:** Karyotyping of human metaphase II oocytes by multi-fluor fluorescence in situ hybridization. *Fertil Steril*, 2003; 4: 1003-1011.
80. **Bernard A, Fuller BJ.:** Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Human Reprod update*, 1996; 2: 193-207.
81. **Parks JE, Ruffing NA.:** Factors affecting low temperatures survival of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 1992; 37: 59-73.
82. **Vicent C, Johnson MH.:** Cooling, cryoprotectants and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxford Rev Reprod Biol*, 1992; 14: 73-100.
83. **Aman RR, Parks JE.:** Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod*, 1994; 50: 103-110.
84. **Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP.:**

Effects of chilling to 0° C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. *Fertil Steril*, 2001; 75: 769-777.

85. **Porcu E, Fabbri R, Seracchioli R.:** Cycles of human oocyte cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection: results of 112 cycles. *Fertil. Steril*, 1999; 72 (Suppl. 1), S2.
86. **Al-Hassani S, Diedrich K, van der Ven H.:** Erste ergebnisse der kryo- konservierung von menschlichen oozyten. *Gebullshilfe Frauenheilkd* 1986; 46: 643-644.
87. **Chuong CJ, Coulam CB.:** Effects of cryopreservation on the viability and fertilizability of unfertilized hamster oocytes. *Am J Obstet Gynecol*. 1986 Dec; 155(6):1240-5.
88. **Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Krebs D.:** Cryopreservation of rabbit oocytes in the pronucleus stage. *Arch Gynecol Obstet*. 1989; 245(1-4):845-7.
89. **Carroll J, Warnes GM, Matthews CD.:** Increase in digyny explains polyploidy after in-vitro fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil*. 1989 Mar; 85(2):489-94.
90. **Nakagata N.:** Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes from inbred strains by ultrarapid freezing. *Jikken Dobutsu*. 1990 Apr; 39(2):303-5.
91. **Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE, Eppig JJ.:** Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. *J Reprod Fertil*. 1990 May; 89(1):43-50.
92. **Tobback C, Hough S, Foote RH.:** A procedure for cryopreservation of hamster oocytes yielding highly conserved oocytes suitable for sperm penetration tests. *Fertil Steril*. 1991 Jan; 55(1):184-8.
93. **Karlsson JO, Eroglu A, Toth TL, Cravalho EG, Toner M.:** Fertilization and development of mouse oocytes cryopreserved using a theoretically optimized protocol. *Hum Reprod*. 1996 Jun; 11(6):1296-305.
94. **Frydman N, Selva J, Bergere M, Auroux M, Maro B.:** Cryopreserved immature mouse oocytes: a chromosomal and spindle study. *J Assist Reprod Genet*. 1997 Nov; 14(10):617-23.
95. **Kubota C, Yang X, Dinnyes A, Todoroki J, Yamakuchi H, Mizoshita K, Inohae S, Tabara N.:** In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. *Mol Reprod Dev*. 1998 Nov; 51(3):281-6.
96. **Lim JM, Ko JJ, Hwang WS, Chung HM, Niwa K.:** Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. *Theriogenology*. 1999 May; 51(7):1303-10. Erratum in: *Theriogenology* 1999 Jul 1; 52 (1):193-4.
97. **Asada M, Fukui Y.:** Effect on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*. 2000 Oct 1; 54(6):889-98.
98. **Luvoni GC, Pellizzari P.:** Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology*. 2000 May; 53(8):1529-40.
99. **Stachecki JJ, Willadsen SM.:** Cryopreservation of mouse oocytes using a medium with low sodium content: effect of plunge temperature. *Cryobiology*, 2000; 40:4-12.
100. **Stachecki JJ, Cohen J, Schimmel T, Willadsen SM.:** Fetal development of mouse oocytes and zygotes cryopreserved in a nonconventional freezing medium. *Criobiology*, 2002; 44:5-13.
101. **Lewin A, Tal Z, Zohav E, Schenker JG.:** Ultrarapid freezing and thawing of hamster oocytes. Morphologic parameters, trypan blue staining and sperm penetration assay for evaluating survival. *J Reprod Med*. 1990 Feb; 35(2):136-40.
102. **Van der Elst L, Neririckx S, Van Steirteghem A.:** Association of ultrarapid freezing of mouse oocytes with increased polyploidy at the pronucleate stage, reduced cell numbers in blastocyst and impaired fetal development. *J Reprod Fertil*, 1993; 99: 25-32.
103. **Isachenko EF, Nayudu PL.:** Vitrification of mouse germinal vesicle oocytes: effect of treatment temperature and egg yolk on chromatin and spindle normality and cumulus integrity. *Hum Reprod*. 1999 Feb; 14(2):400-8.
104. **Kono T, Kwon OY, Nakahara T.:** Development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. *Cryobiology* 1991; 28:50-54.
105. **Shaw PW, Fuller BJ, Bernard S, Shaw RW.:** Vitrification of mouse oocytes: improved rates of survival, fertilization, and development to blastocyst. *Mol Reprod Dev* 1991; 29:373 -378.
106. **Shaw PW, Bernard AG, Fuller BJ, Hunter JH, Shaw RW.:** Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure times on survival. *Mol Reprod Dev* 1992; 33:210-214.
107. **Arav A, Shehu D, Mattioli M.:** Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1993; 99:353-358.
108. **Fuku E, Xia L, Downey BR.:** Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1995; 32:139-156.
109. **Bos-Mikich A, Wood MJ, Candy CJ, Whittingham D.G.:** Cytogenetical analysis and developmental potential of vitrified mouse oocytes. *Biol Reprod* 1995; 53:780-785.
110. **O'Neil L, Paynter SJ, Fuller BJ.:** Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryobiology* 1997; 34:295-301.
111. **Bautista JA, De la Peña EC, Katagiri S, Takahashi**

- Y, Kanagawa H.:** In vitro viability of mouse oocytes vitrified in an ethylene glycol-based solution. *Jpn J Vet Res* 1998; 46:13-18.
112. **Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P.:** Post-vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. *Anim Reprod Sci.* 2000 Nov 1; 63(3-4):159-65.
113. **Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X.:** High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 2000 Aug; 63(2):513-8.
114. **Lane M, Gardner DK.:** Vitrification of mouse oocytes using nylon loop. *Mol Reprod Dev* 2001; 58:342-347.
115. **Park SE, Chung HM, Cha KY, Hwang WS, Lee ES, Lim JM.:** Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improves post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxol, a cytoskeleton stabilizer. *Fertil Steril* 2001; 75:1177-1184.
116. **De la Peña EC, Takahashi Y, Atabay EC, Katagiri S, Nagano M.:** Vitrification of mouse oocytes in ethylene glycol-raffinose solution: effects of preexposure to ethylene glycol or raffinose on oocyte viability. *Cryobiology* 2001; 42:103-111.
117. **Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E.:** Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 2001; 42:139-144.
118. **Mavrides A, Morroll D.:** Cryopreservation of bovine oocytes: is cryoloop vitrification the future to preserving the female gamete?. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42:73-80.
119. **MacLellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Scoggin CF, Bruemmer JE, Squires EL.:** Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from super-stimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology* 2002; 58:911-919.
120. **Vieira AD, Mezzalana A, Barbieri DP, Lehmkuhl RC, Rubin MI, Vatja G.:** Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, 2002; 45 (1): 91-94.
121. **Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL.:** Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology.* 2003 Apr 15; 59(8):1839-50.
122. **Hong SW, Cheng HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B, Cha KY.:** Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 1999; 72:142-146.
123. **Chen SU, Lien YR, Chao K.:** Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil Steril*, 2000; 74: 804-808.
124. **Liebermann J, Tucker MJ, Sills ES.:** Cryoloop vitrification in assisted reproduction: analysis of survival rates in >1000 human oocytes after ultra-rapid cooling with polymer augmented cryoprotectants. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2003.