



## Maturação *in vitro* de oócitos ovinos submetidos à congelação lenta

*In vitro* maturation of cryopreserved ovine oocytes subjected to slow freezing

Letícia Soares de Araújo Teixeira<sup>2</sup>, Marlene Sipaúba de Oliveira<sup>2</sup>, Matheus Soares Alves<sup>5</sup>, Raul Andrei de Assis Dantas<sup>5</sup>, Nayla Maria da Silva Rezende Amorim<sup>3</sup>, Wallisson Bruno Moraes Pacheco<sup>3</sup>, Misael das Virgens Santana<sup>3</sup>, Kenney de Paiva Porfirio<sup>3</sup>, Geovani Carvalho Nepomuceno<sup>4</sup>, José Adalmir Torres Souza<sup>1</sup>, Rômulo José Vieira<sup>1</sup>, Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro<sup>1</sup>, Janaina de Fátima Saraiva Cardoso<sup>1</sup>, Leonardo Tondello Martins<sup>4</sup>, Ney Rômulo de Oliveira Paula<sup>1</sup>

Universidade Federal do Piauí<sup>1</sup>, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Teresina, PI, Brasil.

Universidade Federal do Piauí<sup>2</sup>, Programa de Residência Multiprofissional na Área de Reprodução Animal, Teresina, PI, Brasil.

Universidade Federal do Piauí<sup>3</sup>, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, PI, Brasil.

Universidade de Fortaleza<sup>4</sup>, Fortaleza, CE, Brasil.

Universidade Estadual do Ceará<sup>5</sup>, Fortaleza, CE, Brasil.

### Resumo

A maturação *in vitro* de oócitos submetidos ao processo de criopreservação, ainda compreende um desafio para o sucesso da reprodução assistida na medicina veterinária. Devido a isso, estudos são desenvolvidos a fim de identificar, amenizar e superar as limitações encontradas. Nesse sentido, objetivou-se realizar a avaliação da maturação *in vitro* de oócitos ovinos após criopreservação pelo método de congelação lenta. Para tanto, foram colhidos 204 ovários oriundos de 102 ovelhas púberes (SPRD) pertencentes a abatedouros localizados no município de Teresina, Piauí. Os ovários foram transportados para o laboratório e, posteriormente, foram aspirados por meio de um aspirador cirúrgico adaptado. Um total de 180 oócitos foram desnudados e, então, submetidos à congelação lenta em sistema automatizado (TK 3000®). Posteriormente foram descongelados, e submetidos à maturação *in vitro* (MIV). Em seguida, procedeu-se a avaliação da maturação nuclear. Os resultados foram avaliados por meio do teste de Qui-quadrado de Pearson ( $P \leq 0,05$ ). Após descongelação, 22,8% dos oócitos na avaliação em estereomicroscópio (45x) apresentavam lesões de zona pelúcida e de oolema. Dos 139 oócitos submetidos a MIV, oito maturaram (5,75%). Conclui-se que a congelação lenta de oócitos ovinos pode influenciar a maturação *in vitro*, devido a lesões de membrana plasmática e zona pelúcida.

**Palavras-chave:** Criopreservação, meiose, oócito, ovelha.

### Abstract

The *in vitro* maturation of oocytes submitted to the cryopreservation process, still comprises a challenge for the success of assisted reproduction in veterinary medicine. Due to this, studies are developed in order to identify, ameliorate and overcome the limitations found. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* maturation of ovine oocytes after cryopreservation by the slow freezing method. For that, 204 ovaries from 102 pubertal sheep (SPRD) belonging to slaughterhouses located in the city of Teresina, Piauí, were collected. The ovaries were transported to the laboratory and subsequently aspirated by means of an adapted surgical aspirator. A total of 180 CCO's were obtained, which were stripped and then subjected to slow freezing in an automated system (TK 3000®). Later they were thawed and submitted to *in vitro* maturation (IVM). Next, the nuclear maturation was evaluated. Results were evaluated using Pearson's chi-square test ( $P \leq 0.05$ ). After thawing, 22.8% of the oocytes in the stereomicroscope (45x) evaluation presented lesions of the zona pellucida and oolema. Of the 139 oocytes submitted to IVM, eight matured (5.75%). It is concluded that slow freezing of sheep oocytes may influence *in vitro* maturation due to plasma membrane and zona pellucida lesions.

**Keywords:** Cryopreservation, meiosis, oocyte, sheep.

### Introdução

A maturação oocitária *in vivo* ocorre próximo a ovulação, devido ao pico de estradiol e consequentemente o pico pré-ovulatório de LH (hormônio luteinizante), visto que o LH tem a função de completar a maturação final do oócito até a fase de metáfase II da segunda divisão meiótica, ou seja,

<sup>1</sup>Correspondência: neyromulo@ufpi.edu.br

Recebido: 15 de julho de 2019

Aceito: 17 de setembro de 2019

reiniciando a meiose I, antes estacionada na fase de prófase I e subfase diplóteno, dessa maneira, preparando-o para uma possível fecundação. Já a maturação *in vitro*, primeira etapa da produção *in vitro* de embriões, consiste no desafio de desenvolver, *in vitro*, condições similares às encontradas no interior do ovário para que possibilite a maturação nuclear e citoplasmática necessária, tornando o oócito apto a ser fecundado (Freitas et al., 2007; Araújo et al., 2014; Paramio e Izquierdo, 2016).

Nesse sentido, pesquisas na área de biotécnicas aplicadas à reprodução assistida em animais de produção têm recebido destaque, uma vez que proporcionam aumento significativo do número de animais com genética selecionada e de alto mérito zootécnico, auxiliando o melhoramento genético dos rebanhos no Brasil. Dentre as biotécnicas, estudos são realizados na área de criopreservação de gametas, a fim de estabelecer protocolos eficazes para manutenção da integridade e viabilidade celular, minimizando as perdas durante as etapas do processo e durante o período em que as células criopreservadas permanecem armazenadas (Chian et al., 2004; Bogliolo et al., 2007; Carvalho et al., 2011).

Na criopreservação de oócitos, espermatozoides e embriões, existem dois métodos conhecidos, a congelação lenta e a vitrificação. A congelação clássica ou lenta, método convencional, é caracterizada pela utilização de agentes crioprotetores em baixas concentrações, assim como pela redução gradual da temperatura, comumente controlada por máquina programável. Ao passo que a vitrificação caracteriza-se por ser um método de rápida redução da temperatura, utilizando elevadas concentrações de agentes crioprotetores. Enquanto a vitrificação apresenta essa desvantagem, a congelação lenta apresenta como vantagem a utilização de baixas concentrações de crioprotetores, uma vez que estes em elevadas concentrações causam toxicidade às células (Carvalho et al., 2011; Prentice e Anzar, 2011; Bandeira et al., 2015; Silva et al., 2016).

Diante das dificuldades ainda enfrentadas para o sucesso da reprodução assistida na medicina veterinária, sobretudo quanto às taxas de maturação *in vitro* de oócitos pós congelação, visando a posterior produção *in vitro* de embriões, objetivou-se por meio deste estudo avaliar a maturação *in vitro* de oócitos ovinos após criopreservação pelo método de congelação lenta.

## Material e Métodos

### *Considerações éticas e local de desenvolvimento da pesquisa*

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí, sob o protocolo de nº 436/18. Após aprovação, o estudo foi conduzido no Setor de Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, *Campus* da Socopo, Teresina, Piauí, Brasil, e no Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento pertencente ao Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza.

### *Colheita de ovários, rastreamento, classificação e seleção de complexos cumulus oócitos (CCO's)*

Foram colhidos 204 ovários oriundos de 102 ovelhas púberes sem padrão racial definido (SPRD) em abatedouros localizados no município de Teresina, Piauí. Imediatamente após a colheita, os ovários foram transportados em garrafa térmica contendo solução salina (NaCl a 0,9%) aquecida a 37°C, suplementada com 40 mg/mL de sulfato de gentamicina. Chegando ao laboratório os ovários foram submetidos a lavagens com solução salina aquecida e mantidos em banho-Maria a 37°C. Em seguida realizou-se a aspiração dos ovários utilizando um aspirador cirúrgico portátil (Aspiramax<sup>®</sup>) adaptado para essa finalidade, contendo na extremidade de aspiração uma agulha 21G (0,8 x 25 mm), sob pressão de 50 mmHg. Os CCO's foram aspirados de folículos ovarianos com diâmetro médio de 3 mm a 6 mm. O conteúdo aspirado permaneceu em repouso por 15 minutos em tubo Falcon de 50 mL contendo 2 mL do meio DMPBS (suplementado com albumina sérica bovina: BSA a 0,4%).

Seguidamente, o pellet contendo os CCO's foi depositado em placa de Petri (100 mm) adicionado de DMPBS (suplementado com BSA a 0,4%), e procedeu-se o rastreamento, classificação e seleção das estruturas oocitárias em estereomicroscópio sob aumento de 45x. A qualidade dos CCO's variou de I a IV, porém, apenas os CCO's de qualidade I e II foram selecionados para as etapas posteriores, totalizando 302 CCO's. Destes oócitos selecionados, 180 foram submetidos ao processo de congelação lenta e 122 oócitos constituíram o grupo controle.

### *Congelação lenta e descongelação dos oócitos*

Logo após a seleção os CCO's foram submetidos ao processo de desnudamento em agitador do tipo Vortex (Phoenix Lufenco<sup>®</sup>), por dois minutos (Gottardi et al., 2012). Essa etapa é indispensável, pois proporciona um maior contato das soluções crioprotetoras com os oócitos. Posteriormente, os oócitos

foram estabilizados em três gotas de 200 µL de etilenoglicol nas concentrações crescentes de 0,5 M, 1,0 M e 1,5 M, uma vez que a exposição ao crioprotetor deve ser gradativa até a concentração mais elevada (1,5 M), na qual os oócitos foram envasados, submetidos à máquina de congelação programável, e posteriormente transferidos para botijões criogênicos, contendo N<sub>2</sub> (Gonçalves et al., 2008). Nesta etapa, grupos de dez oócitos permaneceram incubados durante cinco minutos em cada uma das três gotas, respectivamente.

Ao finalizar a etapa de equilíbrio, os oócitos foram envasados em palhetas francesas (IMV Technologies) de 0,25 mL, em grupos de dez oócitos por palheta, os quais foram alocados na região central da palheta contendo o crioprotetor etilenoglicol a 1,5 M.

Em seguida os oócitos foram submetidos ao método de congelação lenta em freezer programável (TK 3000<sup>®</sup>, TK Tec. Congel. LTDA, Uberaba, MG, Brasil), com curva de criopreservação específica para embriões ovinos, de acordo com o protocolo do fabricante. Ao finalizar esta etapa, as palhetas foram armazenadas em botijão criogênico a -196°C por 30 dias.

As palhetas foram retiradas do botijão criogênico e em seguida transferidas para o descongelador eletrônico (Fertilize<sup>®</sup>) a 37°C por 30 segundos. Na descongelação seguiu-se a sequência inversa ao equilíbrio da congelação (1,5 M, 1,0 M e 0,5 M), pois o objetivo foi remover gradativamente o crioprotetor. Em seguida, os oócitos foram avaliados morfológicamente em estereomicroscópio no aumento de 45x. Os que apresentavam formato esférico e simétrico com ooplasma não contraído e homogêneo, zona pelúcida íntegra, assim como a membrana plasmática, foram considerados viáveis. No entanto, oócitos com citoplasma degenerado, zona pelúcida rompida e membrana plasmática lesionada, foram considerados inviáveis e descartados.

#### *Maturação in vitro dos oócitos viáveis após criopreservação*

Na maturação *in vitro* utilizou-se como meio o TCM 199 suplementado com 10% de soro de ovelha em estro (inativado pelo calor), sais de Earle, L-glutamina e 25Mm de HEPES em placas de Petri de 35 mm. Os oócitos foram agrupados de 20 a 25 por gota de 100 µL de meio de MIV e incubados a 38,5°C em estufa (Sanyo<sup>®</sup>) com atmosfera e umidade controlada, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, sob 3,5 mL de óleo mineral, durante 24 horas.

#### *Avaliação da maturação in vitro (MIV)*

Após a MIV os oócitos foram avaliados em estereomicroscópio (Nikon, Tóquio, Japão) sob aumento de 45x, a fim de identificar a retomada da meiose através da presença do primeiro corpúsculo polar entre a membrana plasmática e o espaço perivitelínico.

#### *Análise estatística*

As análises foram realizadas através do processador de dados SPSS versão 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences). Os resultados foram avaliados pelo teste Qui-quadrado de Pearson a um nível de significância de 5%.

### **Resultados e Discussão**

Observou-se que após a descongelação, 41 (22,8%) oócitos apresentaram lesões de zona pelúcida, ruptura de oolema e citoplasma com aspecto degenerado. Em virtude disso, não foram incluídos na etapa de MIV (Fig. 1).

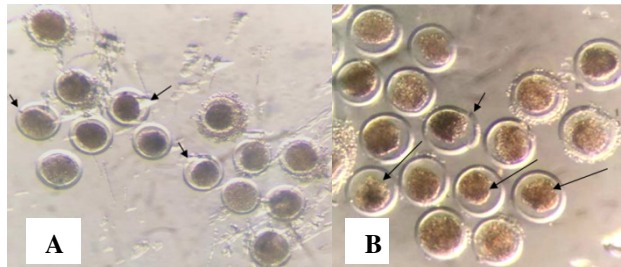


Figura 1. Oócitos ovinos submetidos à congelação lenta em A e B. Setas curtas na imagem A e B, mostram oócitos com zona pelúcida rompida. Setas longas na imagem B, mostram oócitos com citoplasma degenerado.



Dessa forma, dos 180 oócitos oriundos da congelação lenta, 139 seguiram para a etapa de maturação *in vitro* (Tab. 1).

Além disso, verificou-se que a taxa de maturação *in vitro* dos oócitos do grupo congelação lenta (5,8%) foi inferior à taxa de maturação *in vitro* do grupo controle (47,5%) ( $P < 0,001$ ) (Tab. 1).

Tabela 1. Análise dos resultados obtidos entre o grupo de oócitos frescos e o grupo de oócitos submetidos à congelação lenta.

Parâmetros	Fresco/Controle	Congelação lenta	P-valor
	n (%)	n (%)	
Maturados (1° CP)			<0,001*
Maturado	58 (47,5) <sup>a</sup>	8 (5,8) <sup>b</sup>	
Não maturado	64 (52,5) <sup>c</sup>	131 (94,2) <sup>d</sup>	

\*Teste Qui-quadrado de Pearson com 5% (0,05) de significância. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa a  $P < 0,05$ .

Neste estudo, parte dos oócitos oriundos da congelação lenta apresentaram lesões, e um número reduzido de oócitos chegaram a maturar *in vitro*. Isso pode resultar de acordo com Whitingham (1977) a lesões em consequência à formação de cristais de gelo no espaço intracelular e pelo estresse osmótico. Além disso, outras lesões podem ser identificadas, como, por exemplo, a ruptura de zona pelúcida, comprometimento da integridade da membrana plasmática, interrupção da comunicação por junções intercomunicantes entre as células do *cumulus* e o oócito, alterações na conformação do citoesqueleto, perda de microtúbulos e diminuição do potencial de membrana das mitocôndrias (Silva, 2015; Yurchuk et al., 2018; Bus et al., 2019).

Ressalta-se ainda de acordo com Coticchio et al. (2004) e Criado et al. (2011), que oócitos são células de grandes dimensões, possuindo uma área de superfície de membrana pequena, a qual dificulta o transporte de água, sendo uma das principais razões que impedem a correta criopreservação dos oócitos e origina danos celulares irreversíveis.

Ezoe et al. (2015) e Matos et al. (2015) obtiveram uma taxa de 20% de embriões oriundos da PIV, os quais foram provenientes de oócitos criopreservados que chegaram a maturar *in vitro* e progredir para o desenvolvimento embrionário. Em outros estudos já foram encontrados valores mais baixos, como 2,3% e 2% de blastocistos (Zhou et al., 2010; Prentice et al., 2011). Esses resultados demonstram que a criopreservação influencia a competência oocitária nas etapas de produção *in vitro* de embriões, corroborando com os resultados do presente estudo.

A curva de congelação lenta utilizada para a criopreservação dos oócitos foi a mesma utilizada para a criopreservação lenta de embriões, o que possivelmente pode ter contribuído para os resultados alcançados, visto que não leva em consideração as particularidades do oócito em relação as de um embrião, como, por exemplo, a baixa relação superfície-volume, que pode levar ao aumento da sensibilidade ao resfriamento e da sensibilidade a formação de cristais de gelo (Díez et al., 2012).

Observou-se, neste estudo, que a viabilidade oocitária foi influenciada após o congelamento, e Pereira et al. (2008) cita que as principais estruturas morfológicas dos oócitos, como a zona pelúcida, membrana plasmática, fuso meiótico, citoesqueleto e mitocôndrias são altamente sensíveis à criopreservação, uma vez que a maioria das criolesões irreversíveis no oócito ocorrem geralmente nessas organelas e entre a faixa de temperatura de +15°C e -5°C (Martinho et al., 1996). Assim, faz-se necessário a utilização de uma curva de congelação lenta específica para oócitos ovinos a fim de minimizar o tempo de exposição do oócito as faixas de temperaturas mais prejudiciais. Uma maneira de diminuir esse tempo de exposição e consequentemente as crioinjúrias é a utilização da técnica de vitrificação, pois além de diminuir a formação de cristais de gelo previne a concentração progressiva de sais durante o resfriamento (Varghese et al., 2009).

No que se refere à viabilidade oocitária na maturação *in vitro* após a congelação lenta, observou-se oócitos que alcançaram a maturação, entretanto, o número de oócitos maturados foi inferior ao grupo controle, corroborando com os resultados obtidos por Keros et al. (2009), pois a viabilidade dos oócitos após congelação lenta foi menor quando comparados a vitrificação. Isso se dá pelo fato de que a alta concentração de agentes crioprotetores evita a formação de cristais de gelo no espaço intracelular.



### Conclusão

Conclui-se que a congelação lenta pode influenciar o desempenho de oócitos ovinos na maturação *in vitro*, devido principalmente a lesões de membrana plasmática e zona pelúcida. Dessa forma, reduzindo as taxas de maturação *in vitro*.

### Agradecimentos

A equipe do grupo de pesquisa em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí e a equipe do Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento (LBMD) da Universidade de Fortaleza, Ceará.

### Referências

- Araujo MS, Guastali MD, Volpato R, Landim FC.** Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese à maturação *in vitro*. Enciclopedia Biosfera, v.10, n.18, p.2373-2388, 2014.
- Bandeira FT, Carvalho AA, Castro SV, Lima LF, Viana DA, Evangelista JS, Pereira M J, Campelo CC, Figueiredo JR, Rodrigues AP.** Two methods of vitrification followed by *in vitro* culture of the ovine ovary: evaluation of the follicular development and ovarian extracellular matrix. Reprod Domest Anim, v.50, n.2, p.177-185, 2015.
- Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, Succu S, Pau S, Ledda S.** Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. Theriogenology, v.68, n.8, p.1138-1149, 2007.
- Bus A, Langbeen A, Martin B, Leroy JLMR, Bols PEJ.** Is the pre-antral ovarian follicle the 'holy grail' for female fertility preservation. Anim Reprod Sci, v.207, p.119-130, 2019.
- Carvalho AA, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Costa APR.** Vitricificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. Acta Vet Bras, v.5, n.3, p.236-248, 2011.
- Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T.** High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. J Reprod Dev, v.50, n.6, p.685-696, 2004.
- Coticchio G, Bonu MA, Borini A, Flamigni.** Oocyte cryopreservation: a biological perspective. Eur J Obstet Gynec Reprod Biol, v.115, p.2-7, 2004.
- Criado E, Albani E, Novara PV, Smeraldi A, Cesana A, Parini V, Levi-Setti PE.** Human oocyte ultravitrification with a low concentration of cryoprotectants by ultrafast cooling: a new protocol. Fertil Steril, v.95, p.1101-1103, 2011.
- Díez C, Muñoz M, Caamaño JN, Gómez E.** Cryopreservation of the bovine oocyte: current status and perspectives. Reprod Dom Anim, v.47, Suppl 3, p.76-83, 2012.
- Ezoe K, Yabuuchi A, Tani T, Mori C, Miki T, Takayama Y, Beyhan Z, Kato Y, Okuno T, Kobayashi T, Kato K.** Developmental competence of vitrified-warmed bovine oocytes at the germinal-vesicle stage is improved by cyclic adenosine monophosphate modulators during *in vitro* maturation. PloS One, v.10, p.1-14, 2015.
- Freitas VJF, Andrade MLL, Cajazeiras JB, Luz JV.** Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no Nordeste do Brasil. Acta Sci Vet, v.35, p.781-786, 2007.
- Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF.** Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2 ed. São Paulo: Roca, p.408, 2008.
- Gottardi FP, Barretto LSS, Gonçalves FS, Perri SHV, Mingoti GZ.** Efeito das células do cumulus e cisteamina durante o cultivo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência para desenvolvimento embrionário. Arq Bras Med Vet Zootec, v.64, n.2, p.245-252, 2012.
- Keros V, Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe V, Hreinsson J, Hovatta O.** Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. Hum Reprod, v.24, p.1670-1683, 2009.
- Martinho A, Pollard JW, Leibo SP.** Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. Mol Reprod Dev, v.45, p.503-512, 1996.
- Matos JE, Marques CC, Moura TF, Baptista MC, Horta AEM, Soveral G, Pereira RMLN.** Conjugated linoleic acid improves oocyte cryosurvival through modulation of the cryoprotectants influx rate. Reprod Biol End, v.13 p.1-8, 2015.
- Paramio MT, Izquierdo D.** Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants.



Theriogenology, v.86, p.152-159, 2016.

**Pereira RM, Marques CC.** Animal oocyte and embryo cryopreservation. Cell Tissue Bank, v.9, p.267–277, 2008.

**Prentice JR, Anzar M.** Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. Vet Int med, Sep 21;2011. pii: 146405. doi: 10.4061/2011/146405.

**Prentice JR, Singh J, Dochi O, Anzar M.** Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes. Theriogenology, v.75, p.602–609, 2011.

**Silva AMS, Bruno JB, Lima LF, Sá NAR, Lunardi FO, Ferreira ACA, Correia HHV, Aguiar FLN, Araújo VR, Lobo CH, Moura AAA, Campello CC, Smitz J, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Connexin 37 and 43 gene and protein expression and developmental competence of isolated ovine secondary follicles cultured *in vitro* after vitrification of ovarian tissue. Theriogenology, v.85, p.1457-1467, 2016.

**Silva MCMS.** Criopreservação de oócitos: efeito de diferentes protocolos na viabilidade pós-vitrificação. 2015. 55f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2015.

**Varghese AC, Nagy ZP, Agarwal A.** Current trends, biological foundations and future prospects of oocyte and embryo cryopreservation. Reprod BioMed Online, v.19, n.1, p.126-140, 2009.

**Whittingham DG.** Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C. Reprod Fertil Dev, v.49, p.89-94, 1977.

**Yurchuk T, Petrushko M, Fuller B.** Science of cryopreservation in reproductive medicine - Embryos and oocytes as exemplars. Early Hum Dev, v.126, p.6-9, 2018.

**Zhou XL, Naib A, Sun D-W, Sun DW, Lonergan P.** Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. Cryobiology, v.61, p.66–72, 2010.