

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

VITRIFICAÇÃO DE DIFERENTES ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS DE *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS EM MICROVOLUME E EXPOSTOS AO NITROGÊNIO LÍQUIDO A -200°C

MATEUS DA COSTA LANGE

PORTO ALEGRE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

VITRIFICAÇÃO DE DIFERENTES ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS DE *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS EM MICROVOLUME E EXPOSTOS AO NITROGÊNIO LÍQUIDO A -200°C

Autor: Mateus da Costa Lange

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues.

PORTO ALEGRE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

A comissão Examinadora, abaixo assinada,

Aprova a Tese de Mestrado

VITRIFICAÇÃO DE DIFERENTES ESTÁDIOS EMBRIONÁRIOS DE *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS EM MICROVOLUME E EXPOSTOS AO NITROGÊNIO LÍQUIDO À -200°C

Elaborada por

MATEUS DA COSTA LANGE

Como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. José Luiz Rodrigues
FAVET/UFRGS-RS
Orientador e Presidente da Comissão

Dra. Adriana Bos Mikich
Departamento Biociências – UFRGS

Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira
Fundação Federal Faculdade de Medicina Porto Alegre

Dr. Marcelo Bertolini
Faculdade de Veterinária - UDESC - Lages

Dr. Rui Fernando Félix Lopes
Departamento de Biociências - UFRGS

Porto Alegre, 26 de Fevereiro de 2008

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Luiz Rodrigues, pela orientação, pelo incentivo, pelo exemplo de profissionalismo, pela amizade e, principalmente, pela oportunidade da realização de um sonho.

À toda equipe do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da UFRGS pela ajuda na execução deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
BSA	albumina sérica bovina (bovine serum albumin)
CO_2	dióxido de carbono
DMSO	dimetilsulfóxido - Me_2SO
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
EG	etileno-glicol
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
GLY	glicerol
GMP	micropipeta de vidro (glass micropipette)
hCG	gonadotrofina coriônica humana
h	hora (s)
Kg	quilogramas
KSOM	meio de cultivo simplificado acrescido de potássio
L	litro
M	molar
mg	miligramas
min	minuto
mL	mililitro (s)
mm	milímetro
N	número
N_2	nitrogênio líquido
N_2	nitrogênio
O_2	oxigênio
OPS	palhetas esticadas abertas (open pulled straw)
PBE	porcentagem de blastocistos expandidos
PBSm	solução salina fosfatada tamponada modificada
PROH	1,2-propanediol
PVP	polivinil-pirrolidona
seg	segundos
SN_2	nitrogênio líquido ultra-resfriado a -200°C

SV1	solução de desidratação
SV2	solução de vitrificação
SVE	soro de vaca em estro
TC	taxa de clivagem
TS	taxa de sobrevivência
ZP	zona pelúcida

LISTA DE TABELAS

Table 1: Blastocyst expansion rates for mouse embryos vitrified at distinct stages of development.....	26
Table 2: Blastocyst hatching rates for mouse embryos vitrified at distinct stages of development.....	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3	ARTIGO	21
	ABSTRACT.....	21
	INTRODUCTION.....	22
	MATERIALS AND METHODS.....	23
	Reagents and Media.....	23
	Animals.....	24
	Superovulation.....	24
	Embryo Collection.....	24
	Vitrification Procedure.....	25
	Embryo Warming.....	25
	<i>In vitro</i> Culture.....	25
	Statistical Analysis.....	26
	RESULTS.....	26
	DISCUSSION.....	27
	CONCLUSIONS.....	30
	REFERENCES.....	31
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	36
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

Durante a última metade do século XX, consideráveis avanços foram obtidos na reprodução assistida de mamíferos, incluindo a produção *in vitro*, sexagem e criopreservação de embriões.

A tecnologia de criopreservação de células e embriões vem sendo utilizada para preservação genética de animais em vias de extinção, para a reprodução de animais de produção e como ferramenta acessória no tratamento da infertilidade em humanos. Dessa forma, a criopreservação embrionária tem se tornado uma das mais importantes tecnologias nas áreas de biociência, agronegócio e medicina.

Os métodos de criopreservação de embriões podem ser genericamente classificados em métodos de congelação e vitrificação. Os embriões criopreservados através dos métodos de congelação sofrem um resfriamento gradativo com a cristalização do meio extracelular. Na vitrificação, os embriões são submetidos ao resfriamento rápido, através da imersão imediata em nitrogênio líquido, após a exposição a altas concentrações de soluções crioprotetoras, não havendo a formação de cristais de gelo. A vitrificação pode ser definida como a solidificação de um líquido, produzida não pela cristalização, mas por uma extrema elevação na viscosidade durante o resfriamento (FAHY *et al.*, 1984).

Rall e Fahy (1985) foram os primeiros a utilizar com sucesso o processo de vitrificação para a criopreservação de embriões mamíferos, em trabalhos com camundongos. Desde então, a vitrificação tem se mostrado uma técnica simples, rápida e econômica para a criopreservação de embriões de diversas espécies animais.

Segundo Kasai (2002), a viabilidade pós-aquecimento de embriões criopreservados difere não somente devido ao método de criopreservação, mas também varia com a espécie, com o estágio de desenvolvimento e com a qualidade do embrião. Para alguns tipos de embriões, como por exemplo embriões de camundongos, blastocistos bovinos e embriões humanos de 2-8 células; métodos confiáveis de criopreservação foram estabelecidos e são usados como rotina. No entanto, embriões produzidos *in vitro*, por exemplo, são mais sensíveis à criopreservação do que embriões

coletados *in vivo*. Além disso, embriões submetidos à micromanipulação (biopsados, por exemplo) são mais suscetíveis aos efeitos deletérios da criopreservação se comparados a embriões não manipulados.

A criopreservação de alguns tipos de embriões ainda não proporcionou taxas de sobrevivência embrionária satisfatórias, seja utilizando os métodos de congelamento (através de curvas), ou utilizando os métodos rápidos de criopreservação (congelamento ultra-rápido e vitrificação). Por esta razão os estudos na área da criobiologia continuam em constante evolução, buscando alternativas para melhorar a viabilidade de embriões criopreservados.

Segundo Vajta e Nagy (2006), geralmente, oócitos e embriões nos estádios iniciais de desenvolvimento são mais sensíveis aos efeitos nocivos da criopreservação. No caso de oócitos, a baixa relação superfície/volume pode influenciar negativamente a penetração dos agentes crioprotetores, embora as características de permeabilidade de uma célula estejam principalmente relacionadas às propriedades da membrana celular.

O objetivo desse experimento foi avaliar a viabilidade *in vitro* pós-aquecimento de embriões *Mus domesticus domesticus* nos estádios de 2 células, 8 células e blastocisto envasados em microvolume de solução crioprotetora e vitrificados pela imersão em nitrogênio líquido a -200°C .

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul iniciou experimentos de criopreservação de embriões em meados da década de 80. Nos primeiros experimentos foram utilizadas curvas rápidas de congelação ($0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) com a imersão dos embriões em nitrogênio líquido aos -35°C (GREGORY e RODRIGUES, 1985) e a curva de congelação rápida em etapas (ANDRADE e RODRIGUES, 1987). A vitrificação como alternativa de criopreservação para embriões murinos foi usada no Laboratório, inicialmente, nos trabalhos de Lopes e Rodrigues (1988) e Lopes e Rodrigues (1991).

Palha, Lopes e Rodrigues (1991) realizaram um experimento no qual verificaram a influência do tempo de equilíbrio nas soluções crioprotetoras sobre as taxas de sobrevivência *in vivo* (fetos) de mórulas e blastocistos de camundongo vitrificados em macrovolume (palhetas) e transferidos para fêmeas receptoras. Os autores obtiveram taxas de 38% e 31% de desenvolvimento das mórulas em fetos, para aquelas expostas por 5 ou 10 minutos, respectivamente, a uma solução de 10% de glicerol (GLY) e 20% de 1,2 propanediol (PROH). O desenvolvimento *in vivo* dos blastocistos proporcionou percentuais de 17 e 47 % de fetos quando expostos, respectivamente, por 5 ou 10 min à mesma solução.

Diversos experimentos foram realizados no Laboratório utilizando a vitrificação para criopreservação embrionária, avaliando as taxas sobrevivência *in vivo* de embriões vitrificados e expostos por diferentes períodos às soluções de desidratação (HOETZEL e RODRIGUES, 1992), com diferentes soluções crioprotetoras (AGUIAR *et al.*, 1997), e com a adição dos crioprotetores em etapas (CÔRTEZ e RODRIGUES, 2000).

Vieira *et al.* (2006) realizaram um experimento com o objetivo de determinar a sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos, vitrificados em micropipetas de vidro estiradas à mão, produzidos com dois diferentes protocolos de produção *in vitro* (PIV). Os autores concluíram que apesar de uma pequena variação na taxa de desenvolvimento *in vitro* entre os diferentes protocolos, os resultados de sobrevivência *in vitro* e *in vivo* revelaram que, sob condições laboratoriais similares, os diferentes

protocolos não afetaram a viabilidade dos embriões após a vitrificação em micropipetas de vidro estiradas à mão.

Ainda trabalhando com vitrificação em microvolumes, Vieira *et al.* (2007) determinaram a influência de duas soluções de vitrificação a base de etileno-glicol (EG) na vitrificação de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Os embriões foram envasados e vitrificados em micropipetas de vidro (GMP), sendo a diluição dos crioprotetores realizada, durante o aquecimento, em palhetas de 0,25 mL. Os resultados mostraram que ambas as soluções de vitrificação testadas forneceram taxas de prenhez similares após vitrificação dos embriões nas GMP e transferência direta para as fêmeas receptoras.

A vitrificação das soluções é conhecida desde 1937 (LUYET, 1937), mas foi usada pela primeira vez com sucesso para criopreservar embriões em 1985 (RALL E FAHY, 1985). Desde meados dos anos 80, realizou-se consideráveis esforços para desenvolver protocolos mais simples e mais eficientes para vitrificação de embriões, além da busca de soluções de vitrificação mais estáveis e menos tóxicas.

As técnicas tradicionais de envase inicialmente usadas na vitrificação de embriões, como as palhetas de 0,25 mL e criotubos, requerem a utilização de macrovolumes das soluções crioprotetoras. No entanto, novas alternativas que visam aumentar a velocidade de resfriamento e aquecimento dos embriões foram desenvolvidas há mais de uma década e são baseadas na redução do volume e no contato direto das soluções de vitrificação com o nitrogênio líquido (VAJTA, 2000; VAJTA e NAGY, 2006).

De acordo com Kasai (2002), com o aumento das velocidades de resfriamento e aquecimento, durante o processo de vitrificação, as lesões celulares causadas pela formação intracelular de cristais de gelo são prevenidas. Além disso, o volume reduzido das soluções de vitrificação permite a utilização de concentrações menores de crioprotetores com a conseqüente redução da toxicidade, que possibilita maiores taxas de sobrevivência embrionária pós-aquecimento.

Dessa forma, diversas técnicas foram desenvolvidas para a vitrificação de embriões e oócitos, como por exemplo a utilização de grades de microscopia eletrônica - electron microscopic grids (MARTINO *et al.*, 1996), o tamanho mínimo de gota - minimum drop size (ARAV, 1992), as palhetas abertas e esticadas - open pulled straw (VAJTA *et al.*, 1998), “cryoloop” (LANE *et al.*, 1999), o volume mínimo de congelação - minimum volume cooling (HAMAWAKI *et al.*, 1999), sistema de hemi-palheta - hemi-straw system (VANDERZWALMEN *et al.*, 2000), as micropipetas de vidro - glass micropipettes (KONG *et al.*, 2000), a vitrificação em superfície sólida - solid surface vitrification (DYNNEŚ *et al.*, 2000), palhetas esticadas fechadas - closed-pulled straw (CHEN *et al.*, 2001), a malha de nylon - nylon mesh (MATSUMOTO *et al.*, 2001), palhetas esticadas lacradas - sealed open-pulled straws (LÓPEZ-BÉJAR; LÓPEZ-GATIUS, 2002), palheta esticada super fina - super-finely pulled straw (ISACHENKO *et al.*, 2003), micropipeta plástica de diâmetro fino - fine diameter plastic micropipette (CREMADES *et al.*, 2004), “cryotop” (KUWAYAMA *et al.*, 2005) e palheta metálica inoxidável (BUNN *et al.*, 2006).

Kong *et al.*(2000) compararam a sobrevivência pós-aquecimento de blastocistos murinos vitrificados em micropipetas de vidro (GMP) e em palhetas abertas e esticadas (OPS). Avaliaram também o número de embriões e o tipo de envase (localização dos embriões) na vitrificação utilizando as GMP. A solução crioprotetora utilizada na vitrificação era composta de 16,5% de EG, 16,5% de DMSO e sacarose, e nela os blastocistos permaneciam não mais do que 25 segundos. Para a desidratação, foi utilizada uma solução de 10% de EG e 10% de DMSO na qual os embriões ficavam expostos por 1 min. Após o aquecimento, os blastocistos eram lavados sucessivamente por 5 min em soluções de 0,25 e 0,15 M de sacarose. As taxas de reexpansão dos blastocistos vitrificados em GMP (95%) e nas OPS (93,5%) não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), bem como as taxas de eclosão para GMP (90%) e OPS (88,7%). Para determinar o número adequado de embriões por cada GMP, cada micropipeta era envasada com 2 a 10 blastocistos. A taxa de reexpansão após vitrificação foi significativamente maior quando o número de embriões em cada GMP foi de 2 ou 4 (100%) se comparados com 6 (93,7%), 8 (78,1%) e 10 (63,7%) embriões. Além disso, a taxa de reexpansão foi maior quando os blastocistos foram vitrificados na parte estreita da micropipeta se comparados com os localizados na parte larga (100% vs 87,5%, $p < 0,05$), mesmo quando apenas 4 embriões eram envasados por GMP. Os

resultados indicaram que tanto o uso de GMP quanto da OPS, permitiram altas taxas de resfriamento, aquecimento e de sobrevivência dos embriões. No entanto, utilizando a GMP não é necessário o fechamento do capilar para evitar que o mesmo permaneça imerso no N₂. Por fim, o número e a localização dos embriões nas GMP (parte estreita ou larga) foram considerados fatores limitantes para a viabilidade dos embriões murinos vitrificados.

Cho *et al.* (2002) também investigaram o uso da GMP como método de envase na vitrificação de embriões. Os autores compararam a taxa de sobrevivência pós-aquecimento de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* vitrificados em GMP e OPS. A solução de desidratação VS1 era composta de 10% EG e 10% de DMSO, na qual os embriões permaneciam por 1 min. Em seguida, eram transferidos para a solução de vitrificação VS2 (16,5% de EG e 16,5% de DMSO) por 25 seg para então serem imersos em N₂. Durante o aquecimento, os blastocistos permaneciam durante 1 min numa solução de 0,25 M de sacarose, sendo transferidos para outra solução de 0,15 M de sacarose por 5 min. As taxas de reexpansão após o aquecimento foram significativamente diferentes entre os métodos OPS (79,6%) e GMP (90,4%). No entanto, as taxas de eclosão não apresentaram diferenças, sendo de 51,8% para OPS e de 57,1% para GMP. Os embriões vitrificados na parte estreita das GMP reexpandiram em maiores taxas (83,3%) quando comparados com aqueles vitrificados na parte larga (5,7%) ($p < 0,05$). Cada GMP foi envasada com três blastocistos.

Outra técnica que visa aumentar a velocidade de resfriamento, durante o processo de vitrificação, é baseada na diminuição ou eliminação total da camada de vapor que se forma ao redor da amostra colocada em N₂, utilizando o nitrogênio parcialmente solidificado (“nitrogen slush”) ao invés do nitrogênio líquido convencional. A eliminação do vapor pode ser obtida submetendo a amostra de N₂ ao vácuo. Diminuindo a pressão (através do vácuo), a temperatura do N₂ diminui abaixo do ponto de ebulição (aproximadamente -210°C), eliminando as bolhas de gás do entorno da amostra. Portanto, a mínima evaporação gerada pela imersão da amostra promove um considerável aumento da velocidade de resfriamento (ARAV *et al.*, 2000; ARAV *et al.*, 2002; KASAI, 2002; SHAW e JONES, 2003; VAJTA e NAGY, 2006).

Lee *et al.* (2007) realizaram um estudo avaliando o efeito da utilização do

nitrogênio submetido ao vácuo (SN2), na vitrificação de embriões de camundongos micromanipulados. As zonas pelúcidas (ZP) de embriões de 4-células foram preservadas intactas, dissecadas parcialmente (ZP aberta) ou submetidas à biópsia de um blastômero. Num segundo experimento, um blastômero de cada embrião foi destruído e retirado (grupo retirado) ou mantido (grupo mantido) antes de submeter os embriões à vitrificação. Após equilíbrio na solução de vitrificação, os embriões micromanipulados foram envasados em OPS e vitrificados através da imersão em N2 ou SN2. Quando a vitrificação ocorreu em N2, as taxas de recuperação e de formação de blastocisto foram menores para os embriões dos grupos ZP aberta e submetidos à biópsia de blastômero, se comparadas com as taxas observadas no grupo com a ZP intacta. Utilizando o SN2, houve aumento significativo das taxas de sobrevivência e desenvolvimento dos embriões vitrificados dos grupos ZP aberta e submetidos à biópsia de blastômero, sem diferenças para o grupo com a ZP íntegra. Em relação aos grupos de embriões com blastômero destruído (retirado ou mantido), foi observado que as taxas de recuperação e de desenvolvimento até blastocisto foram maiores quando utilizado o SN2 em comparação ao N2, em ambos os grupos. Portanto, os autores propõem que a vitrificação com SN2 pode ser usada como rotina na criopreservação de embriões intactos ou micromanipulados.

De acordo com o destacado por Niemann (1990), independente da velocidade de resfriamento adotada na criopreservação de embriões, e mesmo com os esforços para aumentá-la, a maior parte das células de mamíferos não resiste à congelação abaixo de -20°C , a menos que um aditivo crioprotetor seja adicionado ao meio de suspensão.

Os crioprotetores permeáveis reduzem o ponto de congelação e substituem parte das moléculas de água livre no meio intracelular. Já os crioprotetores não permeáveis, no meio extracelular, auxiliam a desidratação celular e possuem a capacidade de estabilizar as membranas (SHAW e JONES, 2003).

Em geral, a vitrificação é realizada com os mesmos crioprotetores usados nos métodos de congelação. No entanto, devido à necessidade de uma maior concentração das soluções crioprotetoras para a vitrificação, os estudos da última década visaram principalmente reduzir a toxicidade e os danos osmóticos causados pelos crioprotetores. Para isso, diversas abordagens foram empregadas, principalmente no sentido de

encontrar crioprotetores menos tóxicos e com maior permeabilidade. Como resultado, o etileno-glicol (EG) passou a ser o crioprotetor com maior presença nos atuais protocolos de vitrificação (LIEBERMANN *et al.*, 2002; MOORE e BONILLA, 2006; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

O EG foi utilizado primeiramente por Miyamoto e Ishibashi (1977) na congelação de embriões de camundongos e ratos. Em virtude de seu baixo peso molecular (62,07), comparado com o glicerol (GLY) (92,10), 1,2 propanediol (PROH) (76,10) e dimetilsulfóxido (DMSO) (78,13), o EG possui uma maior permeabilidade às células embrionárias além de não necessitar, após o aquecimento, a diluição em etapas (MASSIP, 2001).

A maioria das soluções utilizadas na criopreservação de oócitos e embriões é composta por soluções fisiológicas adicionadas por um ou dois agentes crioprotetores permeáveis às células (p.ex. PROH, EG, DMSO), um crioprotetor não permeável (geralmente açúcares) e uma proteína que facilita a manipulação e a estabilidade da membrana celular. As combinações de dois (ou mais freqüentemente três) crioprotetores, com a finalidade de diminuir a toxicidade específica de cada crioprotetor foram descritas em diversos trabalhos (KASAI *et al.*, 1992; OTOI *et al.*, 1995; SHAW *et al.*, 1995; SHAW *et al.*, 1997; O'NEIL *et al.*, 1997; CSEH *et al.*, 1999; KULESHOVA *et al.*, 1999; HURTT *et al.*, 2000; KULESHOVA *et al.*, 2001; VALOJERDI *et al.*, 2002; FAHY *et al.*, 2004; YAMADA *et al.*, 2007).

Ishimore *et al.*, (1992), vitrificaram mórulas e blastocistos murinos utilizando seis diferentes soluções, sendo cada uma delas composta por 2 tipos de crioprotetores: 1) GLY + EG; 2) GLY + PROH; 3) GLY + DMSO; 4) EG + PROH; 5) EG + DMSO e 6) PROH + DMSO. A concentração de cada crioprotetor nas soluções era de 25%. As taxas de sobrevivência das mórulas foram, respectivamente, para as soluções 1, 2, 3, 4, 5 e 6 de 51, 16, 78, 44, 79 e 50%. As taxas de sobrevivência usando GLY + DMSO e EG + DMSO foram significativamente maiores do que as taxas obtidas nas soluções empregadas nos outros grupos ($p < 0,01$). Os blastocistos apresentaram taxas de sobrevivência de 72, 29, 55, 46, 79 e 48% para os seis grupos respectivamente. Utilizando as soluções de GLY + EG e EG + DMSO as diferenças foram maiores ($p < 0,05$) em relação às demais soluções para o estágio de blastocisto.

Emiliani *et al.* (2000) avaliaram a taxa de sobrevivência (TS), taxa de clivagem (TC) e a porcentagem de blastocistos expandidos (PBE) de embriões de camundongos nos estádios iniciais de desenvolvimento e blastocisto, submetidos à congelação com EG, PROH e GLY. Não foram encontradas diferenças em relação à TC e PBE para embriões expostos ao EG comparados com os não expostos. A TS de zigotos congelados com PROH (92%) foi significativamente maior quando comparada com o uso de EG (60%) ($p < 0,01$). Além disso, a PBE de blastocistos congelados com GLY foi melhor (75%) quando comparada com EG (50%) ($p < 0,05$). Para os embriões no estágio de 4-células, não foram encontradas diferenças nas TS e PBE com o uso do EG e PROH. No entanto, maior PBE foi observada para embriões de 4-células congelados com EG (53%) quando comparado com blastocistos (48%). Por fim os autores observaram que uma baixa toxicidade, taxa de sobrevivência e boa porcentagem de blastocistos expandidos foram alcançadas quando embriões de camundongos foram congelados com EG, sendo os melhores resultados obtidos com embriões de 4-células. Para os outros estádios avaliados o uso da associação de PROH e GLY ofereceu melhores resultados, respectivamente.

Tentativas têm sido realizadas no sentido de substituir os produtos de origem biológica (BSA e SFB) nas soluções de vitrificação por macromoléculas quimicamente definidas, evitando, assim, problemas sanitários (MASSIP, 2001). O uso de macromoléculas na vitrificação tem se tornado comum ultimamente, devido à sua capacidade de aumentar a viscosidade durante o rápido resfriamento, ajudando a evitar a formação de gelo extracelular. Algumas das macromoléculas utilizadas na criopreservação de embriões são o polietileno glicol (PEG), polivinil pirrolidona (PVP), Ficoll, álcool polivinílico (PVA) e Dextran (MOORE e BONILLA, 2006). Quando em baixas concentrações, o polímero sintético PVA, tem sido relatado como agente inibidor da formação de gelo na água e nas soluções crioprotetoras (WOWK *et al.*, 2000; ASADA *et al.*, 2002).

Nowshari e Brem (2000) avaliaram a sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de embriões de camundongos congelados em soluções suplementadas com PVA. Mórulas foram congeladas rapidamente em soluções crioprotetoras de 7 mol/L de EG e 0,5 mol/L de sacarose, sendo a diluição dos crioprotetores, no aquecimento, feita em

soluções com 0,5 mol/L de sacarose. Tanto as soluções crioprotetoras quanto a solução de aquecimento foram suplementadas com 10% de SFB ou 0,1 mg/mL de PVA ou 10% de SFB junto com 0,1 mg/mL de PVA. Os embriões congelados e não congelados (controle, coletados em meio suplementado com SFB) foram cultivados em meios suplementados com 4 mg/mL de BSA ou 0,1mg/mL de PVA por 72 horas. Além disso, as mórulas congeladas em soluções com SFB ou PVA e embriões não congelados foram transferidos para fêmeas receptoras, para avaliação da taxa de implantação e da porcentagem de fetos viáveis. A suplementação das soluções de coleta dos embriões, congelamento e diluição dos crioprotetores com SFB, PVA ou SFB junto com PVA não influenciou as taxas de sobrevivência e de desenvolvimento *in vitro* dos embriões até a eclosão ($p>0,05$). No entanto, a taxa de eclosão *in vitro* dos embriões cultivados em meio com BSA foi significativamente maior do que a do grupo cultivado em meio suplementado com PVA ($p<0,01$). Não houve diferença significativa ($p>0,05$) nas taxas de implantação (68% vs 72%) e de fetos viáveis (62% vs 60%) entre as receptoras prenhes com embriões congelados nas soluções suplementadas com SFB ou PVA. Portanto, os autores concluíram que o PVA pode substituir o SFB nas soluções de congelamento de embriões de camundongos. Por outro lado, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* de embriões com BSA, parece ser ainda a melhor opção para obtenção de maiores taxas de eclosão.

Além da técnica utilizada e do tipo de crioprotetor, existem outros fatores que também influenciam no sucesso da criopreservação de embriões, tais como: a espécie, a origem da produção (*in vivo* ou *in vitro*) e o estágio de desenvolvimento do embrião (MASSIP, 2001; LIEBERMANN, 2002; VAJTA e NAGY, 2006).

Durante o desenvolvimento dos embriões mamíferos, desde o oócito até o estágio de blastocisto, uma série de modificações acontece tanto no tamanho quanto na forma das células embrionárias. As diferenças morfológicas entre os estágios de desenvolvimento também acarretam diferentes sensibilidades ao processo de criopreservação (VAJTA e NAGY, 2006).

Lopes e Rodrigues (1991) vitrificaram mórulas, blastocistos jovens e blastocistos de camundongo, usando uma solução crioprotetora a base de GLY e PROH. Na avaliação da sobrevivência *in vivo*, observaram as seguintes taxas de implantação:

47% (mórulas), 37% (blastocistos jovens) e 19% (blastocistos).

Miyake *et al.* (1993) vitrificaram embriões de camundongo em diferentes estádios de desenvolvimento numa solução crioprotetora a base de EG. Após o aquecimento, a taxa de sobrevivência de embriões 1 célula, avaliada pela clivagem até 2 células, foi de 62%. As taxas de desenvolvimento ao estágio de blastocisto expandido dos embriões vitrificados com 2 e 4 células foram de 77 (44/57) e 80% (49/58) respectivamente. As taxas de desenvolvimento pós-aquecimento observadas no cultivo dos embriões vitrificados nos estágios de 8-células (90% - 60/67), mórulas (95% - 88/93) e blastocistos jovens (91% - 53/58) foram semelhantes às obtidas com os embriões não vitrificados. No entanto, conforme o aumento da blastocite (blastocistos e blastocistos expandidos) as taxas de sobrevivência diminuíram, sendo de 79 (44/56) e 57% (37/65) para os estádios de blastocisto e blastocisto expandido, respectivamente.

Isachenko *et al.* (2003) testaram um procedimento de dupla vitrificação de embriões de rato em diferentes estádios de desenvolvimento (de mórulas jovens a blastocistos expandidos). Mórulas jovens foram vitrificadas, aquecidas e cultivadas *in vitro*. Alguns desses embriões foram então criopreservados novamente (dupla vitrificação) nos estádios de blastocisto jovem, blastocisto e blastocisto expandido. Após a primeira (mórulas jovens) e as duplas vitrificações (blastocistos jovens, blastocistos e blastocistos expandidos) as taxas de desenvolvimento *in vitro* foram, respectivamente, 81, 83, 34 e 76%.

Landa e Tepla (1990) criopreservaram embriões murinos 8-células de duas diferentes linhagens através da técnica de microgota. O desenvolvimento dos embriões vitrificados foi comparável ao desenvolvimento de embriões não vitrificados da mesma origem genética. Após 48 e 96 horas de cultivo *in vitro* 83 e 93% dos embriões vitrificados desenvolveram-se até o estágio de blastocisto, respectivamente.

Ali e Shelton (1993) testaram três diferentes soluções crioprotetoras na vitrificação de embriões de camundongos em diferentes estádios de desenvolvimento. As soluções de vitrificação (SV) utilizadas foram: SV1 (5,5 M de EG + 2,5 M GLY), SV11 (6 M EG + 1,8 M GLY) e SV14 (5,5 M EG + 1M glicose). A SV1 foi tóxica para os embriões de 8-células e estádios mais jovens e a SV11 foi tóxica para os embriões no

estádio de 4-células e mais jovens. Todas SV resultaram em boa viabilidade *in vitro* de mórulas, blastocistos jovens e blastocistos. A SV14 foi considerada a menos tóxicas das três soluções de vitrificação.

Cocero *et al.* (1996) realizaram um estudo comparando o resultado da vitrificação de mórulas e blastocistos de ovelhas com dois diferentes crioprotetores (EG e GLY). A solução de vitrificação contendo EG proporcionou maiores taxas de sobrevivência *in vitro* em comparação com a contendo GLY (64,6 vs 16,0%), enquanto que a diferença entre os crioprotetores foi maior quando mórulas foram usadas (57,9 vs 4,2%) comparadas com blastocistos (70,4 vs 21,5%). Houve uma forte interação entre o tipo de crioprotetor e o estágio de desenvolvimento do embrião ($p < 0,005$).

Em outro experimento, Bertolini *et al.* (2005) avaliaram a sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de embriões de camundongos após a vitrificação em diferentes concentrações e tempos de exposição ao crioprotetor (GLY) previamente à desidratação. Foram vitrificados mórulas compactas, blastocistos e blastocistos expandidos. A sobrevivência *in vitro* de mórulas compactas e blastocistos não foi afetada pelas concentrações e tempos de equilíbrio com o GLY, no entanto, blastocistos expandidos apresentaram menor viabilidade após cultivo *in vitro* de 48 hs. Para avaliação *in vivo*, mórulas compactas, blastocistos frescos e vitrificados foram transferidos para receptoras após cultivo *in vitro* por 1 h. As taxas de prenhez foram semelhantes entre mórulas vitrificadas e frescas (27 e 33% respectivamente), porém os blastocistos vitrificados apresentaram uma taxa de sobrevivência *in vivo* menor que os do grupo controle (9 e 52%, respectivamente).

Uechi *et al.* (1999) compararam o desenvolvimento *in vitro*, até o estágio de blastocisto, de embriões de camundongos 2-células submetidos à vitrificação ou ao congelamento lento. A porcentagem de embriões vitrificados que se desenvolveu até blastocisto foi significativamente menor (22,3%) do que os congelados lentamente (32,8%) e do que os frescos (47,1%). Da mesma forma, a taxa de implantação dos embriões cultivados *in vitro*, a partir de embriões 2- células, foi menor para aqueles que haviam sido submetidos à vitrificação (10,2%) comparando com os que haviam sido congelados lentamente (22,1%) e com o controle (30,8%).

Trabalhando com embriões humanos de 8-células, Raju *et al.* (2005), obtiveram uma taxa de sobrevivência embrionária de 95,3% pós vitrificação, significativamente maior do que a obtida com um protocolo de congelamento lento (60%). As taxas de gravidez foram de 35% para embriões vitrificados e de 17,4% para embriões congelados.

3. ARTIGO

VITRIFICATION OF 2-CELL, 8-CELL AND BLASTOCYST STAGE MOUSE EMBRYOS USING MICROVOLUME AND SUPERCOOLED LIQUID NITROGEN (-200°C)

ABSTRACT

Master's Dissertation

Author: Mateus da Costa Lange

Adviser: José Luiz Rodrigues

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* expansion and hatching rates of vitrified mouse embryos at distinct stages of development, using nitrogen slush and the GMP as embryo container. Embryos were collected and morphologically evaluated based on developmental stage. Only 2-cell, 8-cell and blastocysts stage embryos (day 2, 3 and 4, respectively) were submitted to the vitrification procedures. The embryo container used for vitrification was the glass micropipette (GMP). Embryos were kept in the equilibration solution (10% EG, 10% PROH and 0.5% PVA) for 1 minute. Then, embryos were transferred to the vitrification solution (20% EG, 20% PROH and 0.5% PVA) for 25 s and plunged into supercooled liquid nitrogen (SN_2). Embryo warming and cryoprotectant dilution was carried out by plunging the narrowest end of the GMP into 1 mL droplets of warming solution (WS: 0.25 M sucrose in DPBS supplemented with 0.4% BSA). The expansion rates after 96 hs *in vitro* culture of vitrified 2-cell, 8-cell and blastocysts stage embryos were, respectively, 53.09; 76.97 and 68.30%. Hatching rates were 22; 61.84 and 42.95% for vitrified 2-cell, 8-cell and blastocysts stage embryos respectively. The comparison between vitrified embryos at three distinct stages of development showed that the highest expansion and hatching rates were obtained with 8-cell stage mouse embryos ($P < 0.001$).

Keywords: Vitrification, Mouse embryos, Developmental stage, Glass micropipettes, Nitrogen slush.

INTRODUCTION

The first successful vitrification of mammalian embryos was achieved in mice more than 20 years ago (RALL and FAHY, 1985). Since then, vitrification has been widely used for successful cryopreservation of oocytes and embryos. Vitrification is defined as a solidification of a solution (glass formation) brought about not by crystallization but by its extreme elevation in viscosity during cooling (FAHY *et al.*, 1984). The glass state avoids both chemical and mechanical damage (MASSIP, 2001). This phenomenon can be regarded as an extreme increase in viscosity (usually observed when the cryoprotectant concentration is higher) and requires high cooling and warming rates (VAJTA, 2000).

Unfortunately, consistent results of high embryo survival have not been obtained after cryopreservation by vitrification. The main reasons for the low survival rates are the sensitivity of embryos to chilling, the lower permeability of the cell membrane, which would lead to the formation of intracellular ice and also osmotic over-swelling, and the toxicity of cryoprotectant agent during exposure of cells to the concentrated vitrification solutions (KASAI, 2002 ; KASAI, MUKAIDA, 2004). In attempt to overcome such injuries, modified vitrification methods have been devised in which the cooling and warming rates are markedly increased by minimizing the volume of solutions and the container where embryos are vitrified. Modified vitrification methods employed electron microscopic grids (MARTINO *et al.*, 1996), open pulled straws (VAJTA *et al.*, 1998), cryoloops (LANE *et al.*, 1999), hemi-straw system (VANDERZWALMEN *et al.*, 2000), glass micropipettes (KONG *et al.*, 2000), closed-pulled straws (CHEN *et al.*, 2001), nylon meshes (MATSUMOTO *et al.*, 2001), sealed open-pulled straws (LÓPEZ-BÉJAR; LÓPEZ-GATIUS, 2002), super-finely pulled straws (ISACHENKO *et al.*, 2003), fine diameter plastic micropipettes (CREMADES *et al.*, 2004) and cryotops (KUWAYAMA *et al.*, 2005).

Another strategy that aims to increase the cooling rates during vitrification is based on the reduction or total elimination of the vapour coat that arises around the sample during plunging into liquid nitrogen. Using the supercooled nitrogen, partially solidified (nitrogen slush), instead of the liquid nitrogen for cooling is one possibility. The elimination of vapour can be obtained by subjecting a sample of liquid nitrogen to

vacuum. Lessening the pressure (through vacuum), the temperature of liquid nitrogen decreases below the boiling point (about -210°C), eliminating gas bubbles surrounding the sample. Therefore, the minimized evaporation generated by the immersion of the sample promotes a considerable increase in cooling rates (ARAV *et al.*, 2000; ARAV *et al.*, 2002; KASAI, 2002; SHAW, JONES, 2003; VAJTA, NAGY, 2006).

In the past years, different combinations of cryoprotectants have been published for the vitrification of mammalian oocytes and embryos (KASAI *et al.*, 1992 ; KULESHOVA *et al.*, 1999 ; KULESHOVA *et al.*, 2001, YAMADA *et al.*, 2007). As a consequence of the high concentrations required, latest research was focused in decreasing the toxic and osmotic damage, finding less toxic and more permeable cryoprotectants. As a result, ethylene glycol has become an almost standart part of present vitrification protocols (MASSIP, 2001; VAJTA, KUWAYAMA, 2006).

In addition to the choice of appropriate cryoprotectants agents, there is a number of factors that affect the efficiency of cryopreservation, such as species (genotype), *in vivo* or *in vitro* produced embryos and the developmental stage (MASSIP, 2001; KASAI, 2002; KASAI, MUKAIDA 2004; LIEBERMANN *et al.*, 2002, VAJTA, NAGY, 2006). The influence of these aspects related to embryo cryopreservation are still poorly understood. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* expansion and hatching rates of vitrified mouse embryos at distinct stages of development, using nitrogen slush and the GMP as embryo container.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and Media

All reagents were from Sigma (St. Louis, MO, USA), tested for use in embryos. Media and solutions were prepared using purified water by the Milli-Q Synthesis (Milipore, Bedford, MA, USA) system.

Animals

Swiss Albine mice (*Mus dosmesticus domesticus*) were used in this experiment. Males with reproductive capacity verified had aged between two and ten months. Females were between six and eight weeks of age. Animals were kept under controlled temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) and light (14h light/10h dark cycle), with constant ventilation. Food and water were provided *ad libitum*.

Superovulation

Females were superovulated by intraperitoneal injection of 10 IU eGG (Equine chorionic gonadotropin - Folligon® - Intervet) and 10 IU hCG (Human Chorionic Gonadotropin - Chorulon® - Intervet) 46 h apart. Following the hCG injection, females donors were mated overnight with fertile males (1 female/male). The presence of a vaginal plug was checked early next morning (day 1 of pregnancy).

Embryo Collection

Donors with a vaginal plug were separated from males and separated into three groups to be submitted to embryo collection on days 2, 3 or 4 (48, 72 and 96 h after the hCG injection, respectively). Females were sacrificed by cervical dislocation and the oviducts and uterine horns were flushed individually with 0.5 mL holding medium, composed of DPBS (phosphate-buffered saline) supplemented with 0.4% bovine serum albumin (BSA). Structures obtained upon collection were washed and selected under a stereomicroscope. Embryos were morphologically evaluated based on developmental stage. Only 2-cell, 8-cell and blastocyst stage embryo (day 2, 3 and 4 respectively) were submitted to vitrification procedures, after 5 to 6 h *in vitro* culture in 100 μL droplets of KSOM medium supplemented with 0.4% BSA, under oil, at 37°C, 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ and saturated humidity.

Vitrification Procedure

The container used for vitrification was the glass micropipette (GMP). The GMP were made from capillary tubes softened by heat, and pulled manually until the outer diameter reached approximately 0.6 mm. The hand-pulled GMP were broken at the narrowest point, after being scribed with a diamond tip. The equilibration solution (ES) was composed of 10% EG, 10% PROH and 0.5% polyvinyl alcohol (PVA). Embryos were kept in the ES for 1 min before being transferred to vitrification solution (VS) composed of 20% EG, 20% PROH and 0.5% PVA at 37°C. Embryo loading was performed by capillarity by placing the narrowest end of GMP into 1-2 μ l VS droplets. Embryos were exposed for 25 s to the VS before plunging into liquid nitrogen (LN₂) submitted to vacuum (nitrogen slush). Loaded GMP were stored in LN₂ tank for later embryo warming. Each GMP were loaded with 5 embryos.

Embryo Warming

For embryo warming and cryoprotectant dilution, the narrowest end of GMP was plunged into a 1mL droplets of warming solution (WS: 0.25 M sucrose in DPBS supplemented with 0.4% BSA) at 37°C. Embryos remained in WS for 3 min, subsequently, embryos were washed and transferred to KSOM for *in vitro* culture.

***In vitro* Culture**

Control group (non-vitrified) and vitrified embryos from all three stages of development were *in vitro* cultured in 100 μ L droplets of KSOM supplemented with 0.4% of BSA, under oil, at 37°C, 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ and saturated humidity. The expansion, re-expansion and hatching rates were evaluated after 96 hours of *in vitro* culture.

Statistical Analysis

Expansion, re-expansion and hatching rates were analyzed using the chi-square test for a level of significance of $P < 0.05$.

RESULTS

Results for expansion and hatching rates of various stages of development are summarized in Tables 1 and 2, respectively. Significant differences existed in expansion and hatching rates between the control group and vitrified embryos at the 2-cell stages and blastocysts. However, no differences in expansion and hatching rates were observed between the control group and vitrified 8-cell stage embryos. The comparison between vitrified embryos from three stages of development showed that the highest expansion and hatching rates were obtained with 8-cell stage embryos ($P < 0.001$). Three replications were carried out for each treatment. The relative efficiency, calculated by dividing the hatching rates of vitrified embryos by the hatching rates of the control group in each treatment were, respectively, for 2-cell, 8-cell and blastocyst stage of 44.24; 91.15 and 45.40%.

Table 1: Blastocyst expansion rates for mouse embryos vitrified at distinct stages of development

Developmental Stage	Treatment	Embryos		Expansion	
		N	N	%	
2-cells	Control	62	43	69.35 ^A	
	Vitrified	113	60	53.09 ^B	
8-cells	Control	68	59	86.76 ^C	
	Vitrified	152	117	76.97 ^C	
Blastocyst	Control	74	74	100.00 ^D	
	Vitrified	142	97	68.30 ^A	

Numbers in the same column with different letters differ significantly, $P < 0.05$.

Table 2: Blastocyst hatching rates for mouse embryos vitrified at distinct stages of development

Developmental Stage	Treatment	Embryos		Hatching	
		N	N	%	
2-cells	Control	62	31	50.00 ^A	
	Vitrified	113	25	22.12 ^B	
8-cells	Control	68	46	67.84 ^C	
	Vitrified	152	94	61.84 ^C	
Blastocyst	Control	74	70	94.59 ^D	
	Vitrified	142	61	42.95 ^A	

Numbers in the same column with different letters differ significantly, $P < 0.05$.

DISCUSSION

The sensitivity of embryos to cryoprotectants and cryopreservation is variable and highly dependent on the embryo developmental stage. It has been known that the cryopreservation of mouse blastocysts has been more difficult than that of early stage. Blastocysts have a more complex structure than earlier stages of development and its survival after cryopreservation has been reported to be lower than that for morulae and early stages (LOPES, RODRIGUES, 1991; MIYAKE *et al.* 1993; CSEH *et al.*, 1999; BERTOLINI *et al.*, 2005).

Blastocysts differ structurally from 8-cell stage embryos. A major factor that can affect the survival rate of vitrified blastocysts is that the blastocyst contains a fluid-filled cavity called blastocoele (LIEBERMANN *et al.*, 2002). Miyake *et al.* (1993) showed that the survival rate of vitrified blastocysts decreased as the blastocoele

enlarged. Our results with blastocysts have showed that trend. The likelihood of ice crystal formation is greater in larger blastocoeles. Another factor that may be associated with lower re-expansion and hatching rates for vitrified blastocysts, in the present experiment, is the insufficient permeation of EG inside the cavity, that might allow the ice crystal formation. Vanderzwalmen *et al.* (2002) suggest that intrablastocoelic water, which is detrimental to vitrification, may remain after a 3 min exposure to EG solution, also showing that survival rates in cryopreserved expanded blastocysts could be improved by the artificial reduction of the blastocoelic cavity.

Cryopreservation of embryos may result in hardening of the zona pellucida, which may affect hatching rates. Several studies have reported the influence of zona pellucida damage on further *in vitro* development (RALL, MEYER, 1989; PTAFF *et al.*, 2000). Furthermore, some blastomeres of embryos can be damaged during the vitrification and warming procedure. Necrotic blastomeres of partially damaged embryos can affect subsequent *in vitro* development and viability of vitrified embryos. This may have been one of the causes of lower expansion and hatching rates observed with vitrified 2-cell embryos in this study. Liu *et al.* (2005) suggested that the presence of damage blastomere has a negative influence on the further development of intact ones. The authors observed that the removal of necrotic blastomeres from cryopreserved embryos that were partially damaged may decrease the toxic effects of the necrotic blastomeres on the intact ones.

The vitrification state is dictated by the composition of the solution and also by other factors, mainly, the cooling and warming rates. Thus, ice crystals may develop only during warming (de-vitrification) or during both cooling and warming. Due to the interactions between ice formation and the cooling and warming conditions, it is possible to have both vitrifying and ice-forming regions within the same solution. After the vitrification procedure in this study, the solution with embryos in all loaded GMP were transparent (vitrified, glass-like state). However, even transparent solutions may contain countless invisible ice crystals, because ice crystals only become detectable optically once they become larger in size (SHAW, JONES, 2003).

The present investigation indicated that 2 step vitrification procedure, performed within 1 min in low concentration of EG and PROH (equilibration solution) and 25 sec

on vitrification solution (20% EG, 20% PROH) is a suitable, easy, simple and efficient procedure. For embryo warming and cryoprotectant dilution, the narrowest end of GMP were plunged into 1 mL droplets of warming solution. Closed systems are usually immersed into water baths for embryo warming, while open systems (present study) can be directly immersed into the medium (warming solution). In this way, warming and cryoprotectant dilution are performed in a single step, which was a simple and easy procedure to perform.

During vitrification, liquid nitrogen boils upon sample immersion, resulting in gas bubbles around the GMP, which results in poor heat transfer and potential cryodamage (LEE *et al.*, 2007). In the present study, the nitrogen slush (-200°C) was possible made by applying a vacuum condition to liquid nitrogen. Thus, vacuum lowers the boiling point of the liquid nitrogen and raises the evaporation rate. As the boils off, the temperature of the remaining liquid nitrogen falls (SHAW, JONES, 2003). So the introduction of nitrogen slush and the GMP in the present study increased cooling rate and, thus, the efficiency of vitrification.

When embryos are cryopreserved by vitrification, ice crystal formation is prevented by the use of high concentrations of cryoprotectants allied to high cooling and warming rates. Increasing the speed of cooling permits the use of lower concentrations of cryoprotectants with consequent reduction of their toxicity (VAJTA, NAGY, 2006). Consequently, one of the ways to increase the cooling speed and, reducing the cryoprotectant concentration, is to subject embryos to vitrification in smaller volumes (microvolume). The use of hand-pulled GMP as embryo container permits higher cooling and warming rates than other containers (e.g. OPS) due to the higher heat conductivity of glass and lower mass of the solution containing the embryos (KONG *et al.*, 2000). A special care must be taken during the loading step to restrict the embryos and vitrification solution to the narrow portion of the hand-pulled GMP container. Kong *et al.* (2000) showed that the survival of embryos cooled in GMP vessels was lower when the embryo suspension filled both the narrow and a portion of the wide column. According to the authors, embryos that remained on the wide column of GMP vessel would cool and warm at slower rates and would be subjected to an increased likelihood of injury due to crystallization of the vitrification solution.

Proteins routinely used in embryo cooling solutions, such as bovine serum and bovine serum albumin (BSA) were replaced, in the present study, by the chemically defined macromolecule, polyvinyl alcohol (PVA). The advantage to use chemically defined macromolecules for cooling is to avoid potential sanitary problems caused by animal-derived supplements (NOWSHARI, BREM, 2000; MASSIP, 2001). In addition, PVA, as a polymer has been reported to protect cell membranes during the cooling process, also preventing embryo adhesion to glass and surfaces during the vitrification procedure (WOWK *et al.*, 2000; ASADA *et al.*, 2002).

CONCLUSIONS

The *in vitro* survival rates of mouse embryos vitrified at different stages of development demonstrated that 8-cell stage embryos to be more suitable for the tested vitrification procedure.

REFERENCES

- ARAV, A.; ZERON, Y.; OCHERENTNY, A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 248, 2000.
- ARAV, A. *et al.* New trends in gamete's cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 187, p. 77-81, 2002.
- ASADA, M. *et al.* Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 58. p. 1199-1208, 2002.
- BERTOLINI, M.; LANGE, M.C.; RODRIGUES, J.L. In vitro and in vivo survival of mouse morulas and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 245-251, 2005
- CHEN, S.U. *et al.* Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. **Human Reproduction**, v.16, p. 2350-2356. 2001.
- CREMADES, N. *et al.* Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. **Human Reproduction**, v. 19, p. 300-305, 2004.
- CSEH, S. *et al.* Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions. **Theriogenology**. v. 52, p. 103-113, 1999.
- FAHY, G. M. *et al.* Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**. San Diego, California, v. 21, p. 407-429, 1984.
- ISACHENKO, V. *et al.* Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 445-452, 2003.

KASAI, M. *et al.* Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 1134-1139, 1992.

KASAI, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. **Reproductive Medicine and Biology**. v. 1, p. 1-9, 2002.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, p. 164-170, 2004.

KONG, I.K. *et al.* Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology**, v. 53, p. 1817-1826, 2000.

KULESHOVA, L. *et al.* Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have a low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 119-130, 1999.

KULESHOVA, L.L.; SHAW, J.M.; TROUNSON, A.O. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. **Cryobiology**, v. 43, p. 21-31, 2001.

KUWAYAMA, M. *et al.* Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive Biomedical Online**, v. 11, p. 608-614, 2005.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 1073-1078, 1999.

LEE, D.R., *et al.* Effect of using slush nitrogen (SN₂) on development of microsurgically manipulated vitrified /warmed mouse embryos. **Human Reproduction**. p. 1-6, 2007.

LIEBERMANN, J. *et al.* Potencial importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1671-1680, 2002.

LIU, W.X. *et al.* Effects of removal necrotic blastomeres from mouse cryopreserved embryos on blastocyst formation and hatching. **Theriogenology**, v.64, p. 1114-1120, 2005.

LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. **Theriogenology**, v. 58, p. 1541-1552, 2002.

LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Sobrevivência in-vivo de embriões murideos vitrificados. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 15, p. 75-80, 1991.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1059–1069, 1996.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction of Domestic Animals**. v. 36, p. 49-55, 2001.

MATSUMOTO, H. *et al.* Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, p. 139–144, 2001.

MIYAKE, T. *et al.* Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. **Theriogenology**, v. 40, p. 121-134, 1993.

NOWSHARI, M. A.; BREM, G. The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. **Theriogenology**, v. 53, p. 1157-1166, 2000.

PTAFF, R.T. *et al.* Cryobiology of rat embryos I: determination of zygote membrane permeability coefficients of water and cryoprotectants, their activation energies, and the development of improved cryopreservation methods. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 1294 – 1302, 2000.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature** (London), v. 313, p. 573-575, 1985.

RALL, W, F.; MEYER, T. K. Zona fracture damage and its avoidance during cryopreservation of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 31, p. 683-692, 1989.

SHAW, J.M.; JONES, G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. **Human Reproduction Update**. v. 9, n.6, p. 583-605, 2003.

VAJTA, G. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction Development**, v. 51, p. 53 – 58, 1998.

VAJTA, G; Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 357-364, 2000.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236 – 244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 12, p.779-796, 2006.

VANDERZWALMEN, P. *et al.* *In vitro* survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocyst after vitrification in an hemi-straw (HS) system. **Fertility and Sterility**, v. 74, p. 215-216, 2000.

VANDERZWALMEN, P. *et al.* Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. **Human Reproduction**, v.17, p.744-751, 2002.

YAMADA, C. *et al.* Immature bovine oocyte cryopreservation: comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**. v. 99, p. 384-388, 2007.

WOWK, B. *et al.* Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**, v. 40, p. 228-236, 2000.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A utilização da vitrificação como método de criopreservação apresenta diversas vantagens e benefícios. A formação de cristais de gelo é evitada com o aumento das taxas de resfriamento, através do aumento da velocidade da condução de temperatura. A redução do volume das soluções nas quais os embriões são vitrificados permite a utilização de concentrações menores de agentes crioprotetores, reduzindo, assim, seus efeitos tóxicos.

Diversas variáveis podem influenciar a eficácia da vitrificação e o seu potencial de melhorar as taxas de viabilidade de embriões criopreservados. Entre elas podem ser destacadas o tipo e a concentração dos agentes crioprotetores, a temperatura da solução de vitrificação no momento da exposição, a duração da exposição dos embriões nas soluções crioprotetoras antes da imersão no nitrogênio líquido, o tipo de envase utilizado, além da qualidade e do estágio de desenvolvimento embrionário.

O aumento da velocidade de resfriamento e a diminuição da concentração das soluções crioprotetoras vêm sendo a estratégia utilizada por muitos autores para a criopreservação de células e embriões através das técnicas de vitrificação. No entanto, cada célula tem sua taxa de resfriamento ótima, ou seja, aquela na qual se obtém maiores índices de sobrevivência. Até o momento, um protocolo de vitrificação universal, para todos os tipos celulares, ainda não foi definido. Dessa forma, a obtenção de resultados mais consistentes de viabilidade de embriões vitrificados, utilizando as técnicas atuais, pode vir a estabelecer protocolos de vitrificação padronizados para serem aplicados nas diferentes espécies e nos diferentes estádios de desenvolvimento embrionário.

Um dos argumentos contra a utilização da vitrificação para criopreservar embriões humanos e de animais domésticos é baseado no risco de transmissão de patógenos através do contato direto das amostras com o nitrogênio líquido. A vitrificação em sistemas abertos (com o contato direto da amostra com o nitrogênio líquido) é uma técnica que apresenta relativa simplicidade de execução. No entanto, as

ferramentas e técnicas tradicionais utilizadas na vitrificação de embriões são vulneráveis, existindo, portanto o risco do nitrogênio líquido ser um veículo de contaminação. Dessa forma, as condições sanitárias dos embriões vitrificados nesses sistemas devem ser boas, comparáveis com aquelas de embriões vitrificados nos sistemas fechados (sem contato da amostra com nitrogênio líquido). Segundo alguns autores, o risco dessa contaminação pode ser minimizado submetendo o nitrogênio líquido à filtração, com a finalidade de reter possíveis contaminantes, como bactérias e fungos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P.R.L. *et al.* Vitriificação de embriões *Mus musculus* em 9,0 M de etileno-glicol. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, p. 21-29, 1997.
- ALI, J.; SHELTON, N. Vitriification of preimplantation stages of mouse embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 459-465, 1993.
- ANDRADE, T.P.; RODRIGUES, J.L. Efeito da concentração de sacarose na solução crioprotetora na congelação rápida de embriões *Mus musculus*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.11, p. 69-72, 1987.
- ARAV, A. Vitriification of oocytes and embryos. *In*: LAURIA, S., GANDOLFI, F. (Eds.), **Embryonic Development and Manipulation in Animal Production**. Portland Press, London and Chapel Hill, 1992. cap. 22, p. 255-264.
- ARAV, A.; ZERON, Y.; OCHERENTNY, A. A new device and method for vitriification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 248, 2000.
- ARAV, A. *et al.* New trends in gamete's cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 187, p. 77-81, 2002.
- ASADA, M. *et al.* Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitriification of *in vitro* matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 58. p. 1199-1208, 2002.
- BERTOLINI, M.; LANGE, M.C.; RODRIGUES, J.L. *In vitro* and *in vivo* survival of mouse morulas and blastocysts following vitriification in 45% glycerol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 245-251, 2005.
- BUNN, S. *et al.* Reduction in cryoprotectant concentrations on the vitriification of immature bovine oocytes, under a high cooling rate. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 309, 2006.
- CHEN, S.U. *et al.* Vitriification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. **Human Reproduction**, v.16, p. 2350-2356. 2001.
- CHO, S.K. *et al.* Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitriified by glass micropipette (GMP). **Animal Reproduction Science**, v. 73, p. 151-158, 2002.

COCERO, M.J. *et al.* Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. **Cryobiology**, v. 33, p. 502-507, 1996.

CÔRTEZ, C.G.P.; RODRIGUES, J.L. Sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em meio contendo 9,0 M de etileno-glicol na presença de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 461-467, 2000.

CREMADES, N. *et al.* Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. **Human Reproduction**, v. 19, p. 300-305, 2004.

CSEH, S. *et al.* Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions. **Theriogenology**, v. 52, p. 103-113, 1999.

DINNYÉS, A.; *et al.* High development rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 513-518, 2000.

EMILIANI, S. *et al.* Comparison of ethylene glycol, 1,2 propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. **Human Reproduction**, v. 15, p. 905-910, 2000.

FAHY, G. M. *et al.* Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**. San Diego, California, v. 21, p. 407-429, 1984.

FAHY, G. M. *et al.* Improved vitrification solutions based on predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, v. 48, p. 22-35, 2004.

GREGORY, R.M.; RODRIGUES, J.L. Utilização de duas concentrações de glicerol no congelamento de embriões bovinos. **Anais do VI Simpósio Nacional de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, p. 375, 1985.

HAMAWAKI, A.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. **Theriogenology**, v. 51, p. 165, 1999.

HOETZEL, M.J.; RODRIGUES, J.L. Efeito do período de equilíbrio na solução crioprotetora intracelular a 20°C na sobrevivência In Vivo de blastocistos de *Mus musculus* vitrificados. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 20, p. 173-187, 1992.

HURTT, A. E. *et al.* Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenology**, v. 54, p. 119-128, 2000.

ISACHENKO, V. *et al.* Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 445-452, 2003.

ISHIMORI, H.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. **Theriogenology**, v. 37, p. 481-487, 1992.

KASAI, M. *et al.* Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 1134-1139, 1992.

KASAI, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 1, p. 1-9, 2002.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, p. 164-170, 2004.

KONG, I.K. *et al.* Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology**, v. 53, p. 1817-1826, 2000.

KULESHOVA, L. *et al.* Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have a low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 119-130, 1999.

KULESHOVA, L.L.; SHAW, J.M.; TROUNSON, A.O. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. **Cryobiology**, v. 43, p. 21-31, 2001.

KUWAYAMA, M. *et al.* Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive Biomedical Online**, v. 11, p. 608-614, 2005.

LANDA, V.; TEPLA, O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. **Folia Biol (Praha)**, v. 36, p. 153-158, 1990.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 1073-1078, 1999.

LEE, D.R., *et al.* Effect of using slush nitrogen (SN₂) on development of microsurgically manipulated vitrified /warmed mouse embryos. **Human Reproduction**, p. 1-6, 2007.

LIEBERMANN, J. *et al.* Potencial importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1671-1680, 2002.

LIU, W.X. *et al.* Effects of removal necrotic blastomeres from mouse cryopreserved embryos on blastocyst formation and hatching. **Theriogenology**, v.64, p. 1114-1120, 2005.

LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Vitriificação de embriões *Mus musculus*. In **Anais: III Reunião Anual e I Reunião Internacional da Sociedade Brasileira de Transferência de embriões**, Santa Maria – RS, p. 8, 1988.

LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Sobrevivência *in vivo* de embriões murideos vitrificados. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 15, p. 75-80, 1991.

LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. **Theriogenology**, v. 58, p. 1541-1552, 2002.

LUYET, B.J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. **Biodynamica**, v. 1, n. 39, p. 1-14, 1937.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1059–1069, 1996.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 36, p. 49-55, 2001.

MATSUMOTO, H. *et al.* Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, p. 139–144, 2001.

MIYAKE, T. *et al.* Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. **Theriogenology**, v. 40, p. 121-134, 1993.

MIYAMOTO, H.; ISHIBASHI, T. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 373-375, 1977.

MOORE, K.; BONILLA, A. Q. Cryopreservation of mammalian embryos: the state of the art. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 8, p. 19-32, 2006.

NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine embryos in the field. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 8, n.1, p. 5-7, 1990.

NOWSHARI, M. A.; BREM, G. The protective action of polyvinyl alcohol during rapid-freezing of mouse embryos. **Theriogenology**, v. 53, p. 1157-1166, 2000.

O'NEILL, L. *et al.* Vitrification of mature mouse oocytes: Improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. **Cryobiology**, v. 34, p. 295-301, 1997.

OTOI, T. *et al.* The development of immature bovine oocytes cryopreserved by 1,2-propanediol. **Journal of Reproduction and Development**, v.41, p. 361-366, 1995.

PALHA, M.D.C.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Influência do tempo de equilíbrio na vitrificação de mórulas compactas e blastocistos de *Mus musculus*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 15, p. 65-73, 1991.

PTAFF, R.T. *et al.* Cryobiology of rat embryos I: determination of zygote membrane permeability coefficients of water and cryoprotectants, their activation energies, and the development of improved cryopreservation methods. **Biology of Reproduction**, v.63, p. 1294 – 1302, 2000.

RAJU, G. A. R., *et al.* Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, p. 434-437, 2005.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature** (London), v. 313, p. 573-575, 1985.

RALL, W, F.; MEYER, T. K. Zona fracture damage and its avoidance during cryopreservation of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 31, p. 683-692, 1989.

SHAW, J.M.; WARD, C.; TROUNSON, A.O. Fertilization and early embryology: Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. **Human Reproduction**, v. 10, p. 396-402, 1995.

SHAW, J.M. *et al.* Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll or Dextran. **Cryobiology**, v. 35, p. 219-229, 1997.

SHAW, J.M.; JONES, G.M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. **Human Reproduction Update**, v. 9, n.6, p. 583-605, 2003.

UECHI, H. *et al.* Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development. **Human Reproduction**, v. 14, p. 2827-2832, 1999.

VAJTA, G. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction Development**, v. 51, p. 53 – 58, 1998.

VAJTA, G; Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p. 357-364, 2000.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236 – 244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 12, p.779-796, 2006.

VALOJERDI, M. R.; MOVAHEDIN, M.; HOSSEINI, A. Improvement of development of vitrified two-cell mouse embryos by vero cell coculture. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 19, p. 31-38, 2002.

VANDERZWALMEN, P. *et al.* *In vitro* survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocyst after vitrification in an hemi-straw (HS) system. **Fertility and Sterility**, v. 74, p. 215-216, 2000.

VANDERZWALMEN, P. *et al.* Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. **Human Reproduction**, v.17, p.744-751, 2002.

VIEIRA, A.D. *et al.* Bovine *in vitro* embryo production protocol: does it really influence embryo cryotolerance?. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 57-63, 2006.

VIEIRA, A.D. *et al.* In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovin blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 377-383, 2007.

WOWK, B. *et al.* Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**, v. 40, p. 228-236, 2000.

YAMADA, C. *et al.* Immature bovine oocyte cryopreservation: comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 384-388, 2007.