

## VITRIFICAÇÃO: UMA ALTERNATIVA PARA A PRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES E MATERIAL GENÉTICO DE FÊMEAS MAMÍFERAS EM CRIOBANCOS

[Vitrification: an alternative for preserving embryos and genetic material mammalian females in cryobanking]

Adeline de Andrade Carvalho<sup>1,2</sup>, Luciana Rocha Faustino<sup>1</sup>, José Ricardo de Figueiredo<sup>1</sup>, Ana Paula Ribeiro Rodrigues<sup>1</sup>, Amilton Paulo Raposo Costa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais (LAMOFOPA), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia e Reprodução, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, PI

**RESUMO** - A vitrificação é um método de criopreservação barato, rápido e fácil de ser realizado e tem sido usado com relativo sucesso para a preservação de embriões e oócitos obtidos a partir de folículos antrais e pré-antrais. A presente revisão descreve os diferentes métodos de vitrificação, os principais resultados obtidos, bem como sua importância para a tecnologia de reprodução assistida em humanos, animais de genética superior e espécies mamíferas ameaçadas de extinção.

**Palavras-Chave:** Blastocisto, oócito, folículo ovariano pré-antral, criopreservação.

**ABSTRACT** - Vitrification is a cryopreservation method's cheap, fast and easy to perform and has been used, with relatively success, for the preservation of embryos and oocytes from preantral and antral follicles. The present review describes the different methods of vitrification, the main results obtained so far as well as its important for the assisted reproduction technologies in human, genetic superior animal and endangered mammalian species.

**Keywords:** Blastocyst, oocyte, preantral follicle, cryopreservation.

### INTRODUÇÃO

A aplicação de determinadas técnicas na reprodução assistida tem evidenciado a necessidade de preservação de embriões e células reprodutivas para a manutenção de bancos de germoplasma (Bogliolo et al., 2007). Nesse contexto, diversos estudos são realizados na área de criopreservação para o estabelecimento de protocolos eficientes que permitam a manutenção da viabilidade celular (Chian et al., 2004).

Atualmente, são relatados dois métodos para criopreservação, isto é, a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta, método convencional, é caracterizada pela utilização de baixas concentrações de agentes crioprotetores e pela redução gradual da temperatura, geralmente controlada por um freezer programável (Mukaiida et al., 2003; Naik et al., 2005). Apesar de este método ser amplamente difundido, a sua aplicação em programas de reprodução assistida apresenta um custo relativamente alto devido à necessidade de equipamentos sofisticados. Além disso, a formação

de cristais de gelo intracelulares (CGI), que ocorre durante a realização do processo de congelação, representa um grande desafio a ser vencido, tendo em vista que esse fenômeno é um dos principais responsáveis por danos celulares irreversíveis durante a criopreservação (Morató et al., 2008). Portanto, para se obter uma preservação efetiva é necessária a utilização de um sistema ou técnica que previna a cristalização da água. Desta forma, a vitrificação solucionaria esse problema, uma vez que nesse método, há a produção de um estado vítreo com os sistemas biológicos em que as células vivas podem sobreviver (Pegg, 2007).

O principal objetivo de um protocolo de criopreservação é atingir temperaturas criogênicas sem danos químicos e sem formação de gelo intracelular e isso pode ser idealmente alcançado pela vitrificação (Rubinsky, 2003). O método de vitrificação foi reportado pela primeira vez no começo da década de 40 por Luyet para a preservação de sêmen de sapo após desidratação em sacarose (Luyet, 1940). Desde então, vários pesquisadores têm relatado diferentes resultados

obtidos com a utilização da vitrificação de células germinativas em inúmeras espécies.

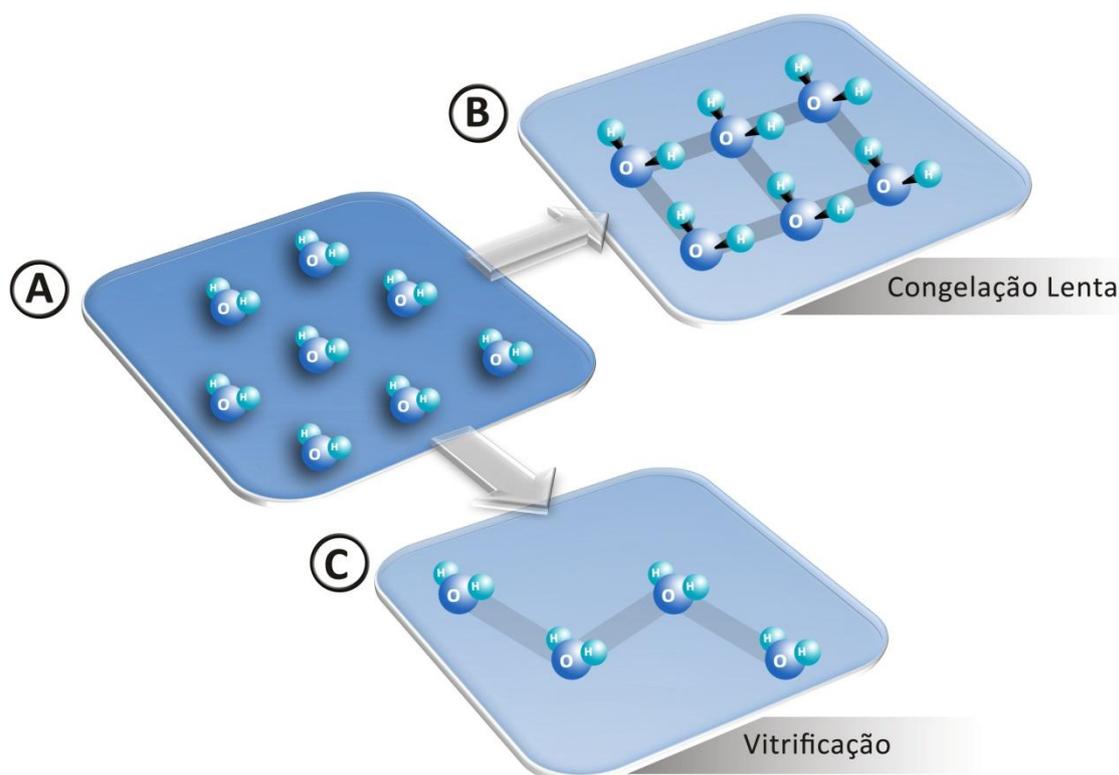
O objetivo desta revisão é apresentar a descrição das diferentes técnicas de vitrificação, bem como os principais resultados obtidos para a preservação de embriões e células de linhagem reprodutiva feminina.

### PROCESSO DE VITRIFICAÇÃO

A vitrificação é caracterizada por altas concentrações de agentes crioprotetores (ACP), proporcionando viscosidade à solução de vitrificação a um valor suficientemente alto para comportar-se como um sólido, porém sem cristalização (Ali & Shelton, 1993; Dobrinski et al., 2000; Rubinsky, 2003, Chian et al., 2004). A termodinâmica mostra que se um líquido é resfriado suficientemente rápido

a temperaturas criogênicas (resultando em queda de temperatura  $>10.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), pode-se evitar a congelamento por se transformar em um estado altamente viscoso e amorfo, conhecido como vidro ou vítreo sólido (Fig.1). Conceitualmente, algo que está no estado vítreo amorfo (diferentemente de um cristal) é essencialmente um fluido com as propriedades mecânicas de um sólido (Rubinsky, 2003; Naik et al., 2005; Balaban et al., 2008).

A vitrificação foi rapidamente adotada como um método prático alternativo à congelamento lenta de espermatozoides, oócitos e embriões, tanto na medicina reprodutiva humana quanto veterinária, devido à simplicidade na sua execução, rentabilidade econômica e velocidade do procedimento de preservação (Vajta et al., 1998). Atualmente, vários trabalhos também têm mostrado a utilização desse método para a criopreservação de tecido ovariano (Dela Peña et al., 2002; Isachenko et al., 2003; Choi et al., 2008; Moniruzzaman et al., 2009). Embora,



**Figura 1.** Representação esquemática da organização molecular em estado líquido (A), no qual as moléculas de água possuem uma maior movimentação por encontrarem-se unidas por ligações fracas (pontes de hidrogênio). Durante a realização do procedimento de congelamento lenta, forma-se um estado cristalino caracterizado por um sólido organizado (B), no qual as moléculas estão unidas por um maior número de ligações e estas se dispõem de forma fixa e hexagonal, resultando em um afastamento das moléculas e formação de cristais. Já no processo de vitrificação, observa-se um estado de não-equilíbrio, conhecido como estado vítreo (C), caracterizado por um sólido amorfo em que parte das cadeias moleculares encontra-se desorganizada, permitindo certa flexibilidade entre as moléculas.

tenha sido demonstrado uma sobrevivência equivalente entre um material vitrificado e o fresco ou não criopreservado (Boonkusol et al., 2006; Chen et al., 2006; Sheehan et al., 2006; Santos et al., 2007), a grande maioria dos resultados ainda não apresenta repetibilidade. Esse fato pode ser devido às situações requeridas no processo de vitrificação como: (a) o uso de altas concentrações de ACP, os quais podem ser tóxicos quando metabolizados pelas células; (b) o uso de altas taxas de resfriamento, e (c) de aquecimento, as quais também podem ser difíceis de serem atingidas quando utilizados grandes volumes de solução (Rubinsky, 2003). O conjunto de todas essas características evidencia a necessidade de mais estudos nessa área, na tentativa de desenvolver protocolos ideais de vitrificação para a preservação de células reprodutivas de mamíferos.

### TÉCNICAS DESENVOLVIDAS PARA A VITRIFICAÇÃO

Desde a primeira descrição do processo de vitrificação (Luyet, 1940), diversas técnicas têm sido empregadas na busca de minimizar a quantidade de solução de vitrificação, bem como obter maior redução da temperatura, sem causar grandes perdas celulares. Dentre as diferentes técnicas de vitrificação, pode-se mencionar: **(a)** vitrificação convencional; **(b)** vitrificação em palhetas fechadas (CPS); **(c)** vitrificação em palhetas abertas (OPS); **(d)** pipetas de desnudamento *flexipet* (PDF); **(e)** vitrificação em grades de microscopia eletrônica; **(f)** vitrificação por cobertura direta (DVC); **(g)** *cryoloop*; **(h)** vitrificação em espátula; **(i)** vitrificação por imersão em agulhas; **(j)** vitrificação por superfície sólida; e **(l)** *cryotop*. A descrição de cada uma dessas técnicas é mostrada a seguir.

a) *Vitrificação convencional* – Consiste no uso de palhetas francesas preenchidas com a solução de vitrificação e o material a ser criopreservado, sendo estas palhetas seladas e imediatamente imersas em nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido (Ali & Shelton, 1993; Dela Peña et al., 2002). Uma adaptação deste método, como forma de reduzir a quantidade de solução crioprotetora, é o *método de hemi-palhetas*, no qual a palheta francesa de 0,25 ml é cortada ao meio e em forma de bisel e, na superfície interna, é inserida uma gota da solução de vitrificação com o material a ser vitrificado. A hemi-palheta é, então, mergulhada em N<sub>2</sub> líquido e, em seguida, inserida em uma palheta francesa de 0,5 ml para estocagem (Liebermann & Tucker, 2002). De modo similar à palheta francesa, são empregados criotubos (Bordes et al., 2005; Ishijima et al., 2006), bem como macrotubos de 2 ml (Carvalho et al., 2011), que suportam uma maior quantidade de solução

crioprotetora e um maior tamanho de tecido a ser criopreservado.

b) *Vitrificação em palhetas fechadas* ou *CPS* (do inglês *Closed Pulled Straw*) – Nessa técnica, uma palheta é fabricada artesanalmente a partir de uma palheta francesa, sendo aquecida e alongada, com a finalidade de reduzir o seu diâmetro para facilitar a perda de calor (Chen et al., 2001). As extremidades da palheta são fechadas após a disposição das amostras a serem vitrificadas, impedindo o contato direto das mesmas com o N<sub>2</sub> líquido.

c) *Vitrificação em palhetas abertas* ou *OPS* (do inglês *Open Pulled Straw*) – Na busca por uma taxa de resfriamento ainda mais rápida, a técnica de *palhetas abertas* ou *OPS* mostra-se bastante vantajosa (Fig.2). Essas palhetas são fabricadas semelhantemente às CPS, no entanto, não são fechadas, permitindo o contato direto da amostra a ser vitrificada com o N<sub>2</sub> líquido. O preenchimento de ambas as palhetas (CPS e OPS) é realizado por capilaridade e, então, mergulhadas em N<sub>2</sub> líquido, permitindo a rápida solidificação do material presente em seu interior. Uma preocupação em relação ao uso da OPS é o risco de contaminação da amostra através do íntimo contato com o N<sub>2</sub> líquido (El-Gayar & Holtz, 2001).

d) *Pipetas de desnudamento flexipet (PDF)* – Outro método, semelhante à OPS, consiste no uso de *pipetas de desnudamento flexipet (PDF)*, utilizadas na manipulação de embriões (Liebermann et al., 2002; Morató et al., 2008). Essas palhetas possuem características semelhantes à OPS, com a vantagem de serem padronizadas no tocante ao tamanho e diâmetro, visto que são fabricadas industrialmente.

e) *Vitrificação em grades de microscopia eletrônica* – Essa técnica também permite o contato direto da amostra com o N<sub>2</sub> líquido. O tecido ou célula submetido ao processo de vitrificação é posto sobre grades de microscopia eletrônica e, em seguida, é imerso no N<sub>2</sub> líquido. Após vitrificação, as amostras são armazenadas no N<sub>2</sub> líquido dentro de criotubos (Kim et al., 2006).

f) *Vitrificação por cobertura direta* ou *DVC* (do inglês *Direct Cover Vitriification*) – Dentre outras técnicas que permitem o contato com o N<sub>2</sub> líquido, a DVC apresenta-se como uma das técnicas que obtêm uma redução de temperatura mais brusca, uma vez que o material dentro do criotubo é coberto pelo N<sub>2</sub> líquido. Essa aplicação direta de N<sub>2</sub> maximiza a taxa de resfriamento, facilitando a passagem para o estado vítreo, permitindo uma menor concentração de ACP na solução de vitrificação. Além disso, a quantidade de solução de vitrificação utilizada é

reduzida, auxiliando no processo de vitrificação (Chen et al., 2006). A técnica de DCV está ilustrada na Fig.3.

g) *Cryoloop* – Partindo da mesma premissa do contato direto da amostra com o N<sub>2</sub> líquido, o método de *cryoloop* tem mostrado resultados satisfatórios com a vitrificação de embriões e oócitos em camundongos (Huang et al., 2005), humanos

(Balaban et al., 2008) e ovinos (Succu et al., 2007). Essa técnica consiste na utilização de um instrumento constituído por uma alça de metal presa com um laço de nylon (Fig.4). Esse laço é preenchido por solução de vitrificação bastante viscosa devido à quantidade de ACP utilizada. Desse modo, o líquido presente no laço confere uma tensão superficial, que mantém o material a ser vitrificado fixo no mesmo. O laço é então mergulhado em N<sub>2</sub>



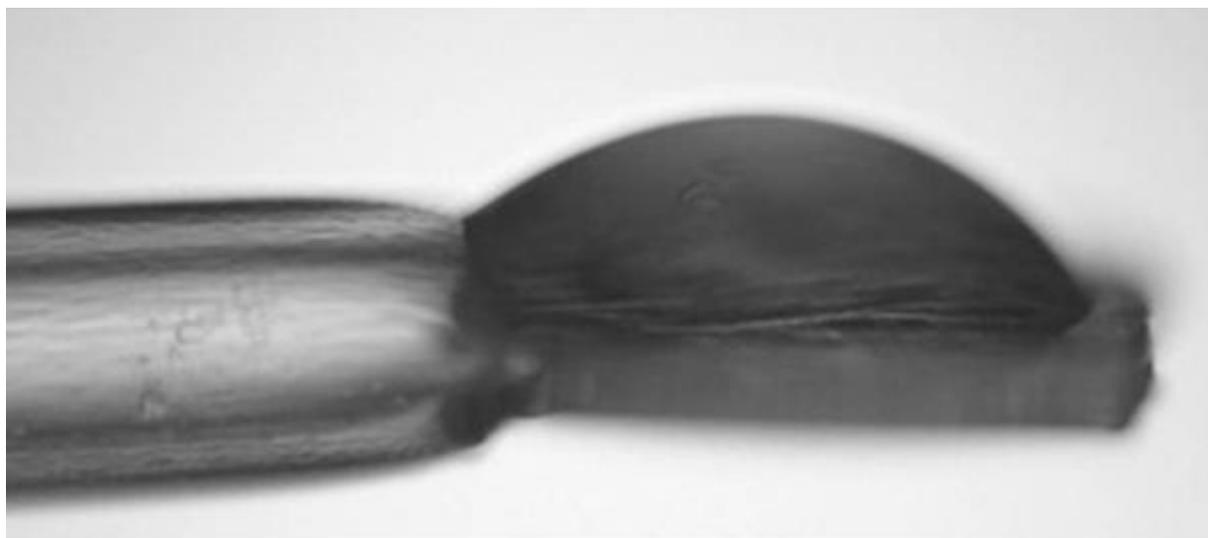
**Figura 2.** Desenho representativo da técnica de OPS, na qual o meio de criopreservação contendo os oócitos preenche a OPS por capilaridade.



**Figura 3.** Foto representativa da técnica de DVC (*Direct Cover Vitrification*). A amostra submetida à vitrificação é coberta por N<sub>2</sub> líquido, proporcionando uma brusca redução na temperatura. Retirado de Chen et al., 2006.



**Figura 4.** Foto representativa da técnica de *cryoloop*, na qual o laço de *nylon* é confeccionado na tampa de um criotubo e a amostra submetida à vitrificação permanece ligada ao laço de *nylon* pela tensão obtida através da viscosidade da solução crioprotetora. Retirado de Saki & Dezfuly, 2005.



**Figura 5.** Foto representativa da vitrificação em espátula, evidenciando a extremidade plana e a gota com o material a ser vitrificado. Retirado de Tsang & Chow, 2009.

líquido e a amostra vitrificada. Em geral, o *cryoloop* é armazenado no interior de criotubos.

h) *Vitrificação em espátula* – Esse método foi desenvolvido por Tsang & Chow (2009), e consiste em uma espátula preparada artesanalmente, de maneira que uma extremidade tenha uma forma plana, onde será colocada uma pequena gota com o material a ser vitrificado. Com o contato direto com o N<sub>2</sub> líquido, a gota solidifica-se e se torna aderida à superfície da espátula (Fig.5).

i) *Vitrificação por imersão em agulhas* ou *NIV* (do inglês *Needle Immersed Vitrification*) –É uma técnica que consiste na utilização de agulhas de

acupuntura, na qual os fragmentos de tecido são perfurados por estas agulhas e então expostos à solução de vitrificação e, em seguida, imersos em N<sub>2</sub> líquido. A grande vantagem deste método é a possibilidade de utilizar vários fragmentos simultaneamente, presos na mesma agulha, submetendo-os às mesmas condições de vitrificação (Wang et al., 2008).

j) *Vitrificação por superfície sólida* – Esta técnica consiste na sobreposição da amostra em um cubo de metal, que pode, inclusive, ser confeccionado artesanalmente com o uso de papel alumínio (Santos et al., 2007). O cubo de metal, posicionado acima do N<sub>2</sub> líquido, por ser um bom condutor de calor,

proporciona um rápido resfriamento da amostra, condição necessária para uma vitrificação eficiente (Fig.6). Posteriormente, a amostra é armazenada em criotubos e mantida em N<sub>2</sub> líquido (Al-Aghbari & Menino, 2002).

1) *Cryotop* – Na tentativa de realizar a vitrificação com uma maior assepsia, a técnica de *cryotop* tem sido bastante utilizada, sobretudo em clínicas de reprodução assistida em humanos. Essa técnica consiste na utilização de uma palheta de polipropileno conjugada a uma haste plástica. Esta haste é utilizada para a manipulação, evitando o contato direto da mão do manipulador com a palheta. Além disso, o *cryotop* também é constituído por uma tampa plástica, que recobre a estrutura (palheta-haste), impedindo o contato com o N<sub>2</sub> líquido, favorecendo uma melhor assepsia do material vitrificado (Chian et al., 2004; Kuwayama et al., 2005; Moniruzzaman et al., 2009).

### ESTADO ATUAL DA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES E OÓCITOS ORIUNDOS DE FOLÍCULOS ANTRAIS E PRÉ-ANTRAIS

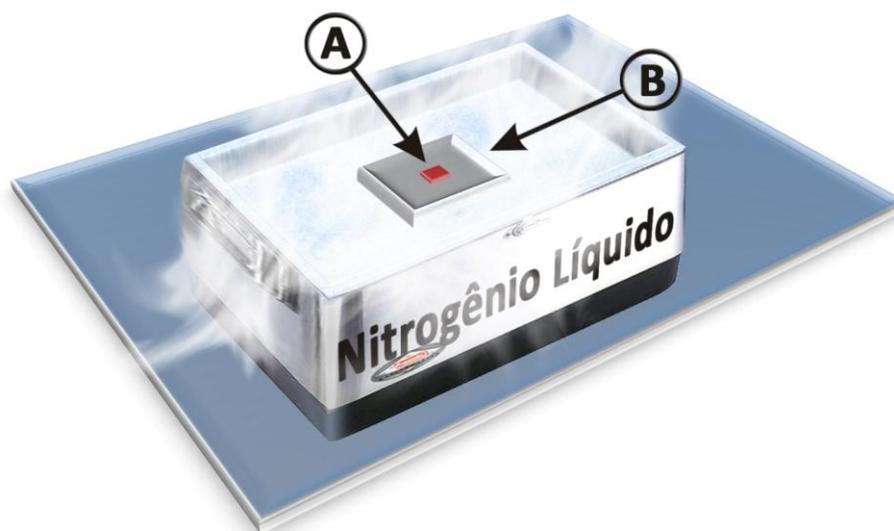
#### Vitrificação de embriões

A vitrificação em embriões foi relatada inicialmente na década de 80 (Rall & Fahy, 1985; Massip et al., 1987) e tem demonstrado sucesso em várias espécies, utilizando diferentes técnicas de vitrificação (humanos: Huang et al., 2005; camundongos: Kasai et al., 1990; bovinos: Park et al., 1999; suínos: Kobayashi et Dobrinski et al.,

2000). Na Tabela 1 encontram-se de forma resumida os principais resultados obtidos com a vitrificação de embriões em diferentes espécies.

Estudos em humanos não relataram diferenças quanto à taxa de sobrevivência embrionária quando a vitrificação foi realizada pela técnica de hemipalheta ou por *cryoloop*, porém houve uma maior taxa de clivagem quando utilizada a técnica convencional de hemipalheta (Liebermann & Tucker, 2002). Apesar de os achados de Liebermann & Tucker (2002) mostrarem que a vitrificação convencional é mais satisfatória, outros autores relatam a superioridade da vitrificação por *cryoloop* em relação a congelação lenta quando avaliadas as taxas de sobrevivência, implantação e desenvolvimento embrionário (Mukaida et al., 2003; Huang et al., 2005; Balaban et al., 2008). Ainda em humanos, também tem sido demonstrado gestação a partir de embriões criopreservados por vitrificação convencional (Yokota et al., 2000), vitrificação em grades de microscopia eletrônica (Son et al., 2002) e por *cryotop* (Hiraoka et al., 2004).

No que se refere a camundongos, as técnicas de vitrificação convencional e *cryoloop* não mostraram diferenças significativas quanto à taxa de implantação entre embriões vitrificados e frescos (Ali & Shelton, 1993; Sheehan et al., 2006; Tsang & Chow, 2009). De maneira semelhante, não houve diferença na taxa de desenvolvimento embrionário entre embriões vitrificados por superfície sólida e não vitrificados. Porém, após o procedimento de vitrificação, os embriões exibiram maior expressão do gene relacionado ao choque térmico - Hsp70



**Figura 6.** A figura representa a técnica de vitrificação por superfície sólida, no qual o fragmento (A) é sobreposto em um cubo metálico (B) parcialmente submerso em N<sub>2</sub> líquido.

**Tabela 1.** Principais resultados obtidos com a vitrificação de embriões.

<b>Técnica de vitrificação</b>	<b>Espécie/Animal</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<b>Vitrificação convencional</b>	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sobrevivência de embriões vitrificados até estágio de 4 células similar a de embriões frescos</li> </ul>	Ali & Shelton, 1993
<b>Vitrificação convencional</b>	Suínos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nascimento de crias normais;</li> <li>Animais obtidos a partir da vitrificação de embriões com a capacidade de gerar descendentes normais</li> </ul>	Dobrinsky et al., 2000
<b>Cryotop</b>	Humanos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gestação avançada (33 semanas)</li> </ul>	Hiraoka et al., 2004
<b>Cryoloop</b>	Camundongos e Humanos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alta taxa de sobrevivência embrionária após cultivo <i>in vitro</i> (77%)</li> </ul>	Huang et al., 2005
<b>Cryoloop</b>	Humanos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alta sobrevivência embrionária (94,8%)</li> </ul>	Balaban et al., 2008
<b>Vitrificação em espátula</b>	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> <li>67,8% de nascimentos</li> </ul>	Tsang & Chow, 2009

(Boonkusol et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que a vitrificação pode causar alterações mitocondriais que podem prejudicar de forma substancial o subsequente desenvolvimento embrionário (Zhao et al., 2009).

Quando aplicada em embriões bovinos, a vitrificação convencional assegurou uma taxa de sobrevivência superior a 57% (Kuwayama et al., 1992), embora essa taxa tenha sido inferior a taxa de sobrevivência de embriões frescos, geralmente próximo a 100% (Ali & Shelton, 1993; Boonkusol et al., 2006). Devido a esta redução na sobrevivência embrionária, tem-se buscado outras técnicas que utilizem menor volume de solução, favorecendo, desta forma, a redução de temperatura e a formação do estado vítreo de forma mais eficiente. Neste sentido, técnicas como a vitrificação em grades de microscopia eletrônica e em OPS vêm sendo utilizadas com sucesso nessa espécie (Park et al., 1999; Vajta et al., 1999). A vitrificação em grades de microscopia eletrônica resultou em melhor qualidade embrionária quando comparada à vitrificação convencional (Park et al., 1999),

enquanto a técnica de OPS, desenvolvida por Vajta et al. (1998), não mostrou diferença significativa com relação a embriões não vitrificados.

A técnica de OPS, para vitrificação de embriões, tem proporcionado maiores taxas de nascimento quando comparada à congelação lenta, tanto em coelhas (Naik et al., 2005) quanto em cabras (El-Gayar & Holtz, 2001). Na espécie suína, os resultados ainda são bastante contraditórios. Kobayashi et al. (1998) relataram uma taxa de sobrevivência embrionária de 94,9% em suínos, contudo, Dobrinsky et al. (2000) demonstraram que a vitrificação foi associada à redução na qualidade embrionária e no desenvolvimento *in vivo* após transferência de embriões previamente vitrificados.

#### **Vitrificação de oócitos oriundos de folículos antrais**

A vitrificação de oócitos tem sido alvo de várias pesquisas, principalmente no que se refere ao grande questionamento acerca do estágio de maturação mais

adequado para a aplicação desse procedimento (Luna et al., 2001; Tharasanit et al., 2006; Gupta et al., 2007). Os principais resultados obtidos com a vitrificação de oócitos em diferentes espécies são mostrados na Tabela 2.

Na espécie suína, devido à grande quantidade de gotas lipídicas intracitoplasmáticas, os resultados obtidos após criopreservação de oócitos mostram-se inferiores àqueles obtidos nas demais espécies. Além disso, os relatos sobre a viabilidade de oócitos suínos vitrificados, em estágio de maturação, ou seja, núcleo em estágio de metáfase II (MII), ou imaturo, são contraditórios. Há relatos de que o estágio de maturação não interfere na viabilidade, taxa de clivagem e formação de blastocistos (Gupta et al., 2007). Contudo, alguns estudos indicam que oócitos maduros são mais sensíveis à vitrificação, resultando em baixa taxa de viabilidade (30%), alterações nos microtúbulos e na organização das mitocôndrias, com comprometimento da fertilização e consequentes alterações cromossômicas nos embriões originados a partir destes oócitos (Somfai et al., 2006; Shi et al., 2007).

Em camundongos, a vitrificação convencional e por CPS de complexo cumulus-oócito (CCO) resultou em maior percentual de sobrevivência que a vitrificação por OPS e por grades de microscopia eletrônica. Contudo, a vitrificação convencional causou uma redução no percentual de fuso meiótico normal. Em virtude disso, a vitrificação por CPS mostra-se mais vantajosa para vitrificação de oócitos de camundongos, uma vez que manteve os percentuais de sobrevivência e fuso meiótico normais (Chen et al., 2001).

A criopreservação de oócitos maduros em humanos por vitrificação convencional demonstrou uma

recuperação mais rápida do fuso meiótico do que a congelamento lenta (Ciotti et al., 2009). Além disso, a vitrificação por *cryoloop* resultou em alta taxa de sobrevivência (80,6%) similar a encontrada em oócitos vitrificados por hemi-palhetas – 85,4% - (Liebermann & Tucker, 2002). A técnica de *cryoloop* também resultou em maior percentual de sobrevivência quando comparada à vitrificação convencional, apesar de não terem sido relatadas diferenças significativas (Saki & Dezfuly, 2005). Contudo, destaca-se a técnica de *cryotop*, que possibilitou o nascimento de gêmeos saudáveis (Sánchez-Serrano et al., 2010).

Em bovinos, oócitos imaturos (estágio de vesícula germinativa) vitrificados de forma convencional mostraram, após maturação *in vitro*, uma redução no percentual de oócitos em metáfase II quando comparados a oócitos imaturos não vitrificados (Cetin & Bastan, 2006). Também foram observadas alterações após vitrificação por OPS, tais como redução no percentual de blastocistos, aumento em anormalidades no fuso (Morató et al., 2009) e na incidência de diploidia (Luna et al., 2001), lise nas células do cumulus e turgidez na crista mitocondrial e retículo endoplasmático (Diez et al., 2005). Apesar dos relatos de alterações pós-vitrificação, a técnica de *cryotop* destaca-se na criopreservação de oócitos, uma vez que uma alta taxa de sobrevivência (97,6%) foi obtida após vitrificação de oócitos maduros (Chian et al., 2004). Além disso, apesar das dificuldades citadas, Viera et al. (2002) relataram nascimento de bezerras normais após a vitrificação de oócitos imaturos por OPS.

Apesar de alguns resultados satisfatórios, a vitrificação de oócitos está associada à redução na qualidade oocitária (Luna et al., 2001; Shi et al., 2007; Morató et al., 2009). Além disso, redução na

**Tabela 2.** Resultados mais relevantes obtidos com a vitrificação de oócitos.

Técnica de vitrificação	Espécie/Animal	Resultados	Referência
Vitrificação convencional e CPS	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Altas taxas de sobrevivência (77-79%)</li> </ul>	Chen et al., 2001
Grades de microscopia eletrônica	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> <li>56,7% de fertilização</li> </ul>	Kim et al., 2006
Vitrificação em hemi-palheta	Humanos	<ul style="list-style-type: none"> <li>71% de maturação oocitária</li> </ul>	Isachenko et al., 2006
<i>Cryotop</i>	Humanos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nascimentos de gêmeos saudáveis</li> </ul>	Sánchez-Serrano et al., 2010

taxa de maturação, anormalidades no fuso (Tharasanit et al., 2006) e fraturas na zona pelúcida com extravasamento do conteúdo celular (Dhali et al., 2000) foram observadas após vitrificação de oócitos de éguas, por OPS (Dhali et al., 2000), e búfalas, por vitrificação convencional (Tharasanit et al., 2006). Em ovinos, por exemplo, danos no fuso meiótico, na cromatina e na membrana celular foram observados após vitrificação de oócitos por *cryoloop* (Bogliolo et al., 2007; Succu et al., 2007), refletindo diretamente na redução na taxa de clivagem e desenvolvimento de blastocistos (Succu et al., 2007). Por outro lado, quando esta mesma técnica foi aplicada em oócitos de coelhas, pode-se observar uma taxa de sobrevivência acima de 80% (Cai et al., 2005).

### Vitrificação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais

A vitrificação de folículos pré-antrais, inclusos (*in situ*) ou não (isolados) no tecido ovariano, tem sido realizada em várias espécies (humanos: Isachenko et

al., 2003; caninos: Ishijima et al., 2006; camundongos: Choi et al., 2008; suínos: Moniruzzaman et al., 2009). A criopreservação de folículos pré-antrais tem como grande vantagem a preservação de milhares de oócitos presentes nessa categoria folicular, a qual corresponde à grande maioria dos folículos presentes no ovário. A Tabela 3 apresenta de forma resumida os principais resultados obtidos com a vitrificação de folículos pré-antrais, inclusos ou não no tecido ovariano, em diferentes espécies.

Em camundongos, a criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais por vitrificação convencional, seguida do desenvolvimento folicular *in vitro*, não mostrou diferenças significativas entre folículos pré-antrais vitrificados e não vitrificados quanto às taxas de maturação e fertilização. Inclusive, foram obtidos nascimentos de crias saudáveis após a transferência desses embriões fertilizados *in vitro* (Dela Peña et al., 2002). Em adição, outros trabalhos também têm demonstrado que a vitrificação de tecido ovariano de camundongas apresenta resultados satisfatórios. Chen et al. (2006), ao compararem diferentes

**Tabela 3.** Principais resultados obtidos com a vitrificação de folículos ovarianos pré-antrais.

Técnica de vitrificação	Espécie/Animal	Resultados	Referência
Superfície sólida	Ovinos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Taxa de maturação de 70%</li> </ul>	Al-Aghbari & Menino, 2002
Vitrificação convencional	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Nascimento de crias saudáveis após transplante de tecido ovariano vitrificado</li> </ul>	Dela Peña et al., 2002
Vitrificação convencional	Humanos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Não divergência entre áreas de necrose entre tecido ovariano fresco e vitrificado</li> </ul>	Rahimi et al., 2004
Vitrificação em criotubos	Ovinos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obtenção de nascimentos após transplante de tecido ovariano previamente vitrificado</li> </ul>	Bordes et al., 2005
Vitrificação convencional e DCV	Camundongos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Morfologia e ultraestrutura folicular melhor preservada pela técnica de DCV</li> </ul>	Chen et al., 2006
Vitrificação convencional	Ovinos	<ul style="list-style-type: none"> <li>Percentual de folículos morfológicamente normais semelhante entre tecido ovariano fresco e vitrificado</li> </ul>	Santos et al., 2007

técnicas de vitrificação de tecido ovariano (vitrificação convencional e DCV) com a congelação lenta, observaram que a DCV proporcionou maior percentual de folículos morfologicamente normais que a vitrificação convencional e a congelação lenta. Além disso, a ultraestrutura, viabilidade folicular, taxa de prenhez e número de crias após transplante do tecido ovariano vitrificado por DCV também se mostraram superiores. Ainda nesta espécie, após vitrificação de tecido ovariano em grades de microscopia eletrônica, foi observada uma redução na expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), antígeno diretamente relacionado com a multiplicação celular, nas primeiras horas de cultivo após a vitrificação. Porém, em 48 h de cultivo, essa expressão foi equivalente ao tecido não vitrificado. Esse resultado revelou que células vitrificadas apresentam um retardo na atividade celular nas primeiras horas após aquecimento. Ademais, foi observado que as células da granulosa são mais sensíveis ao processo de vitrificação, uma vez que um maior número de áreas necróticas foi evidenciado nessas células após o procedimento de vitrificação (Choi et al., 2008).

De forma contrária, a vitrificação convencional de tecido ovariano humano não causou aumento da área necrótica, bem como não divergiu do tecido fresco quanto à morfologia folicular (Rahimi et al., 2004). Essa técnica mostrou-se satisfatória uma vez que os folículos primordiais apresentaram capacidade de desenvolvimento e os níveis de estradiol e progesterona foram crescentes após três semanas de cultivo *in vitro*, não havendo diferença entre os fragmentos de ovário vitrificados e não vitrificados (Isachenko et al., 2003). Quanto à vitrificação de tecido ovariano humano por grades de microscopia eletrônica (Isachenko et al., 2003) e hemi-palheta (Keros et al., 2009), a análise da morfologia folicular e qualidade do estroma não diferiram entre aquelas observadas no tecido fresco e vitrificado. A análise ultra-estrutural do tecido vitrificado revelou, ainda, mitocôndrias estruturadas e organizadas, células da granulosa preservadas, membrana basal uniforme, núcleo intacto e eucromatina homogênea (Keros et al., 2009). Porém, foi evidenciado um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio no tecido ovariano humano vitrificado, o que pode levar a uma redução da qualidade do tecido, assim como aumento de apoptose (Rahimi et al., 2003). Segundo Isachenko et al. (2003), essa redução na qualidade do tecido foi observada quando o tecido ovariano de mulheres previamente vitrificado por grades de microscopia eletrônica foi submetido ao cultivo *in vitro*, no qual foi perceptível uma destruição do estroma.

Em ovelhas, a vitrificação convencional de fragmentos ovarianos mostrou resultados satisfatórios, inclusive com o nascimento de crias saudáveis após transplante (Bordes et al., 2005; Lornage et al., 2006). Entretanto, a análise histológica revelou um menor número de folículos primordiais normais e uma maior quantidade de anormalidades nucleares e citoplasmáticas quando comparada aos fragmentos frescos (Lornage et al., 2006). Também foi relatada uma redução (15-20%) na taxa de maturação *in vitro* de oócitos obtidos a partir de tecido ovariano vitrificado por superfície sólida (Al-Aghbari & Menino, 2002).

Nos caprinos, a vitrificação em superfície sólida resultou em um percentual de 82% de folículos morfologicamente normais e viabilidade, após o cultivo *in vitro*, semelhante ao percentual observado em folículos oriundos de fragmentos não vitrificados (Santos et al., 2007). Contraditoriamente, em cães a vitrificação foi relacionada a danos na estrutura folicular e redução no número de folículos primordiais e primários, quando a vitrificação convencional foi aplicada (Ishijima et al., 2006). De maneira similar, o uso de *cryotop* para vitrificação de tecido ovariano suíno, mostrou uma redução no número de folículos, assim como degeneração oocitária. Entretanto, após xenotransplante, o tecido ovariano transplantado mostrou revascularização satisfatória, porém, os folículos inclusos em tecido previamente vitrificados desenvolveram-se de maneira mais lenta e não atingiram o estágio antral, quando comparados a folículos inclusos em tecido não vitrificado (Moniruzzaman et al., 2009).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme pode ser evidenciado nesta revisão, a técnica de vitrificação tem sido amplamente utilizada com o intuito de preservar o patrimônio genético de diferentes animais ou mesmo a manutenção da função reprodutiva de mulheres submetidas a tratamentos oncológicos. Além de ser uma técnica de baixo custo por não exigir a utilização de equipamentos sofisticados e onerosos, é também prática, de rápida aplicação e tem alcançado resultados satisfatórios. Diante dessas características, a técnica de vitrificação revela-se como uma alternativa promissora e com grande perspectiva de ter seu emprego em condições de campo. Contudo, os resultados, apesar de promissores, apresentam baixa repetibilidade, provavelmente devido a não padronização de protocolos adequados que garantam a viabilidade celular ou tecidual, requerendo intensos estudos nessa área da criobiologia.

## Agradecimentos

Os autores são gratos ao CNPq pelas bolsas concedidas aos pesquisadores Ana Paula Ribeiro Rodrigues e José Ricardo de Figueiredo.

## REFERÊNCIAS

- Al-Aghbari A.M. & Menino Jr A.R. 2002. Survival of oocytes recovered from vitrified sheep ovarian tissues. *Anim Reprod Sci.* 71(1):101-110.
- Ali J. & Shelton J.N. 1993. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil.* 98(2):459-465.
- Balaban B., Urman B., Ata B., Isiklar A., Larman M.G., Hamilton R. & Gardner D.K. 2008. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod.* 23(9):1976-1982.
- Bogliolo L., Ariu F., Fois S., Rosati I., Zedda M.T., Leoni G., Succu S., Pau S. & Ledda S. 2007. Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology.* 68(8):1138-1149.
- Boonkusol D., Gal A.B., Bodo S., Gorchony B., Kitiyanant Y. & Dinnyes A. 2006. Gene expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Mol Reprod Dev.* 73(6):700-708.
- Bordes A., Lornage J., Demirci B., Franck M., Courbiere B., Guerin J.F. & Salle B. 2005. Normal gestations and live births after orthotopic autograft of vitrified-warmed hemi-ovaries into ewes. *Hum Reprod.* 20(10):2745-2748.
- Cai X.Y., Chen G.A., Lian Y., Zheng X.Y. & Peng H.M. 2005. Cryoloop vitrification of rabbit oocytes. *Hum Reprod.* 20(7):1969-1974.
- Carvalho A.A., Faustino L.R., Silva C.M.G., Castro S.V., Luz H.K.M., Rossetto R., Lopes C.A.P., Campello C.C., Figueiredo J.R., Rodrigues A.P.R., Costa A.P.R. 2011. Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology.* 76 (5):933-941.
- Cetin Y. & Bastan A. 2006. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. *Anim Reprod Sci.* 92(1-2):29-36.
- Chen S.U., Chien C.L., Wu M.Y., Chen T.H., Lai S.M., Lin C.W. & Yang Y.S. 2006. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod.* 21(11):2794-2800.
- Chen S.U., Lien Y.R., Cheng Y.Y., Chen H.S., Ho H.N. & Yang Y.S. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod.* 16(11):2350-2356.
- Chian R.C., Kuwayama M., Tan L., Tan J., Kato O. & Nagai T. 2004. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *J Reprod Dev.* 50(6):685-696.
- Choi J.Y., Lee B.E., Lee E.Y., Yoon B.K., Bae D.S. & Choi D.S. 2008. Cryopreservation of ovarian tissues temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. *Cryobiology.* 56(1):36-42.
- Ciotti P.M., Porcu E., Notarangelo L., Magrini O., Bazzocchi A. & Venturoli S. 2009. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril.* 91(6):2399-2407.
- Dela Peña E.C., Takahashi Y., Katagiri S., Atabay E.C. & Nagano M. 2002. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reproduction.* 123(4):593-600.
- Dhali A., Manik R.S., Das S.K., Singla S.K. & Palta P. 2000. Vitrification of buffalo (Bubalus bubalis) oocytes. *Theriogenology.* 53(6):1295-1303.
- Diez C., Duque P., Gómez E., Hidalgo C.O., Tamargo C., Rodríguez A., Fernández L., De La Varga S., Fernández A., Facal N. & Carbajo M. 2005. Bovine oocyte vitrification before or after meiotic arrest: effects on ultrastructure and developmental ability. *Theriogenology.* 64(2):317-333.
- Dobrnisky J.R., Pursel V.G., Long C.R. & Johnson L.A. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod.* 62(3):564-570.
- El-Gayar M. & Holtz W. 2001. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J Anim Sci.* 79(9):2436-2438.
- Gupta M.K., Uhm S.J. & Lee H.T. 2007. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology.* 67(2):238-248.
- Hiraoka K., Hiraoka K., Kinutani M. & Kinutani K. 2004. Case report: successful pregnancy after vitrification of a human blastocyst that had completely escaped from the zona pellucida on day 6. *Hum Reprod.* 19(4):988-990.
- Huang C.C., Lee T.H., Chen S.U., Chen H.H., Cheng T.C., Liu C.H., Yang Y.S. & Lee M.S. 2005. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. *Hum Reprod.* 20(1):122-128.
- Isachenko E., Isachenko V., Rahimi G. & Nawroth F. 2003. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod.* 108(2):186-193.
- Isachenko V., Montag M., Isachenko E., Dessole S., Nawroth F. & Van Der Ven H. 2006. Aseptic vitrification of human germinal vesicle oocytes using dimethyl sulfoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril.* 85(3):741-747.
- Ishijima T., Kobayashi Y., Lee D.S., Ueta Y.Y., Matsui M., Lee J.Y., Suwa Y., Miyahara K. & Suzuki H. 2006. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J Reprod Dev.* 52(2):293-299.
- Kasai M., Komi J.H., Takakamo A., Tsudera H., Sakurai T. & Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil.* 89(1):91-97.
- Keros V., Xella S., Hultenby K., Pettersson K., Sheikhi M., Volpe A., Hreinsson J. & Hovatta O. 2009. Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum Reprod.* 24(7):1-14.
- Kim S.H., Ku S.Y., Sung K.C., Kang M.J., Kim S.A., Kim H.S., Oh S.K., Jee B.C., Suh C.S., Choi Y.M., Kim J.G. & Moon S.Y. 2006. Simplified EM grid vitrification is a convenient and efficient method for mouse mature oocyte cryopreservation. *Yonsei Med J.* 47(3):339-404.

- Kobayashi S., Takei M., Kano M., Tomita M. & Leibo S.P. 1998. Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants. *Cryobiology*. 36(1):20-31.
- Kuleshova L.L. & Lopata A. 2002. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril*. 78(3):449-454.
- Kuwayama M., Hamano S. & Nagai T. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil*. 96(1):187-193.
- Kuwayama M., Vajta G., Ieda S. & Kato O. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*. 11(5):608-614.
- Liebermann J., Tucker M.J., Graham J.R., Han T., Davis A. & Levy M.J. 2002. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the flexipet denuding pipette. *Reprod Biomed Online*. 4(2):146-150.
- Liebermann J. & Tucker M.J. 2002. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*. 124(4):483-489.
- Lornage J., Courbière B., Mazoyer C., Odagescu V., Baudot A., Bordes A., Poirel M.T., Franck M. & Salle B. 2006. Vitrification du tissu ovarien: cortex et ovaire entier chez la brebis. *Gynecol Obstet Fertil*. 34(9):746-753.
- Luna H.S., Ferrari I. & Rumpf R. 2001. Influence of stage of maturation of bovine oocytes at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. *Anim Reprod Sci*. 68(1-2):23-28.
- Luyet B.J. & Geheio P.M. 1940. *Life and Death at Low Temperatures*. 3<sup>ed</sup>. Biodynamica, Normandy, p.352.
- Massip A., Van Der Zwalmen P. & Ectors F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*. 27(1):69-79.
- Moniruzzaman M., Bao R.M., Taketsuru H. & Miyano T. 2009. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology*. 72(2):280-288.
- Morató R., Izquierdo D., Paramio M.T. & Mogas T. 2008. Embryo development and structural analysis of in vitro matured bovine oocytes vitrified in flexipet denuding pipettes. *Theriogenology*. 70(9):1536-1543.
- Mukaida T., Nakamura S., Tomiyama T., Wada S., Oka C., Kasai M. & Takahashi K. 2003. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod*. 18(2):384-391.
- Naik B.R., Rao B.S., Vagdevi R., Gnanprakash M., Amarnath D. & Rao V.H. 2005. Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. *Anim Reprod Sci*. 86(3-4):329-338.
- Park S.P., Kim E.Y., Kim D.I., Park N.H., Won Y.S., Yoon S.H., Chung K.S. & Lim J.H. 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum Reprod*. 14(11):2838-2843.
- Pegg D.E. 2007. Principles of Cryopreservation, p.39-57. In: Day J.G. & Stacey G.N. (ed). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. Humana Press, Totowa.
- Rahimi G., Isachenko E., Isachenko V., Sauer H., Wartenberg M., Tawadros S., Hescheler J., Mallmann P. & Nawroth F. 2004. Comparison of necrosis in human ovarian tissue after conventional slow freezing or vitrification and transplantation in ovariectomized SCID mice. *Reprod Biomed Online*. 9(2):187-193.
- Rahimi G., Isachenko E., Sauer H., Isachenko V., Wartenberg M., Hescheler J., Mallmann P. & Nawroth F. 2003. Effect of different vitrification protocols for human ovarian tissue on reactive oxygen species and apoptosis. *Reprod Fertil Dev*. 15(6):343-349.
- Rall W.F. & Fahy G.M. 1985. Cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Cryobiology*. 22(6):603.
- Rubinsky B. 2003. Principles of Low Temperature Cell Preservation. *Heart Fail Rev*. 8(3):277-284.
- Saki G. & Dezfily F.G. 2005. Vitrification of human oocyte using cryoloop. *IJRM*. 3(1):19-24.
- Sánchez-Serrano M., Crespo J., Mirabet V., Cobo A.C., Escriba M.J., Simón C. & Pellicer A. 2010. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril*. 93(1):268.e11-268.e13.
- Santos R.R., Tharasanit T., Van Haefen T., Figueiredo J.R., Silva J.R.V. & Van Den Hurk R. 2007. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res*. 327(1):167-176.
- Sheehan C.B., Lane M. & Gardner D.K. 2006. The cryoloop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Hum Reprod*. 21(11):2978-2984.
- Shi L.Y., Jin H.F., Kim J.G., Kumar B.M., Balasubramanian S., Choe S.Y. & Rho G.J. 2007. Ultra- structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. *Anim Reprod Sci*. 100(1-2):128-140.
- Somfai T., Dinnyés A., Sage D., Marosán M., Carnwath J.W., Ozawa M., Kikuchi K. & Niemann H. 2006. Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). *Theriogenology*. 66(2):415-422.
- Son W.Y., Yoon S.H., Park S.J., Yoon H.J., Lee W.D. & Lim J.H. 2002. Ongoing twin pregnancy after vitrification of blastocysts produced by in-vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 17(11):2963-2966.
- Succu S., Leoni G.G., Berlinguer F., Madeddu M., Bebbere D., Mossa F., Bogliolo L., Ledda S. & Naitana S. 2007. Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. *Theriogenology*. 68(1):107-114.
- Tharasanit T., Colleoni S., Lazzari G., Colenbrander B., Galli C. & Stout T.A.E. 2006. Developmental competence of equine oocytes vitrified at different stages of maturation. *Anim Reprod Sci*. 94(1-4):291-293.
- Tsang W.H. & Chow K.L. 2009. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques*. 46(7):550-552.
- Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P.J., Jacobsen H., Greve T. & Callesen H. 1998. Open pulled straw (ops) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev*. 51(1):53-58.
- Vieira A.D., Forell F., Feltrin C. & Rodrigues J.L. 2007. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. *Anim Reprod Sci*. 99(3-4):377-383.
- Vieira A.D., Mezzalana A., Barbieri D.P., Lehmkuhl R.C., Rubin M.I.B. & Vajta G. 2002. Calves born after open pulled straw

vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*. 45(1):91-94.

Wang Y., Xiao Z., Li L., Fan W. & Li S.W. 2008. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. *Hum Reprod*. 23(10):2256-2265.

Yokota Y., Sato S., Yokota M., Ishikawa Y., Makita M., Asada T. & Araki Y. 2000. Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum Reprod*. 15(8):1802-1803.

Zhao X.M., Fu X.W., Hou Y.P., Yan C.L., Suo L., Wang Y.P., Zhu H.B., Dinnyés A. & Zhu S.E. 2009. Effect of vitrification on mitochondrial distribution and membrane potential in mouse two pronuclear (2-PN) embryos. *Mol Reprod Dev*. 76(11):1056-1063.