

# CRIOPRESERVAÇÃO DE OVÓCITOS E EMBRIÕES BOVINOS

*Criopreservation of bovine oocytes and embryos*

Angelo José Burla Dias<sup>1</sup>

## Filiación Institucional

<sup>1</sup>Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, Mestrado em Produção Animal pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Doutorado em Biociências e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Professor Associado da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Tem experiência na área de Medicina Veterinária, com ênfase em Reprodução Animal.

## Fecha de correspondencia:

Recibido 15 de julio de 2017.  
Aceptado 3 de diciembre de 2017.



Autor para Correspondencia\*:

angeloburlaenf@gmail.com

## Como citar:

BURLA-DIAS, Angelo J. 2017. Criopreservação de ovócitos e embriões bovinos. Revista Facultad Ciencias Agropecuarias – FAGROPEC. Universidad de la Amazonia, Florencia – Caquetá. 9(2). Pp. 11-15

## Resumo

A criopreservação é uma técnica avançada que envolve estruturas de congelamento a temperaturas muito baixas (-196) para o propósito de preservação por muitos anos, as células ou tecidos. O princípio básico e simples do processo é a remoção de água das células antes da congelamento-los a fim de evitar a formação de cristais. Os agentes crioprotectores podem ser classificados em penetrante (glicerol, DMSO, etileno-glicol e 1,2 propanodiol) e não penetrante (sacarose, trealose e rafinose, polímeros, proteínas e lipoproteínas). Neste texto se descrevem técnicas para a criopreservação de oócitos e embriões a partir das características e fatores que afetam cada um dos métodos.

## Palabras clave:

## Abstract

Cryopreservation is an advanced technique that involve freezing structures at very low temperatures (-196) whith the purpose of preserving cells or tissues for many years. The basic and simple principle of the process is to remove water from the cells before freezing them in order to prevent the formation of crystals. The cryoprotectants agents may be classified as penetrant (glycerol, DMSO, ethylene glycol and 1,2 propanediol) and non-penetrating (sucrose, trehalose and raffinose, polymers, proteins and lipoproteins). This text describes techniques for the cryopreservation of oocytes and embryos from the characteristics and factors that affect each of the methods.

## Key words:

## Introdução

Desde o nascimento do primeiro bezerro por transferência de embrião congelado (WILMUT e ROWSON, 1973), as técnicas de criopreservação têm sido continuamente aprimoradas, sendo hoje um dos principais componentes das modernas tecnologias reprodutivas. Exemplo disso é a grande quantidade de embriões bovinos congelados anualmente. Das 549.279 transferências de embriões produzidos *in vivo* no mundo em 2004, 222.301 (40%) foram de embriões congelados (VIANA, 2005).

O armazenamento de ovócitos e embriões por longos períodos simplifica a movimentação de material genético, permite a preservação de estoques genéticos raros e superiores, facilita o manejo das transferências, além de ter várias possibilidades de aplicação na espécie humana.

Mas apesar da criopreservação ser amplamente utilizada para sêmen e embriões produzidos *in vivo*, ainda persiste a necessidade de desenvolvimento de protocolos mais eficazes, principalmente para embriões zebuínos. Devido a diferenças morfológicas e bioquímicas esses embriões apresentam maior sensibilidade ao congelamento que os embriões taurinos. Possivelmente as menores taxas de prenhez obtidas com embriões zebuínos congelados sejam devido a falta de um protocolo específico para esses embriões.

Em contrapartida o sucesso na criopreservação de ovócitos e embriões produzidos *in vitro* tem sido muito difícil de ser atingido. Atualmente há um interesse crescente para entender os aspectos criobiológicos fundamentais responsáveis pelas baixas taxas de sobrevivência desses gametas e embriões, visando o desenvolvimento de protocolos mais eficientes.

Este trabalho irá revisar as técnicas atuais para criopreservação de ovócitos e embriões, abordando as peculiaridades dos métodos mais utilizados, assim como os fatores que afetam a eficácia da criopreservação dessas estruturas.

## Métodos de criopreservação

Os princípios da criopreservação são similares para todas as células vivas e a maioria deles origina-se de leis da natureza, como as leis da termodinâmica. Provavelmente, o princípio mais simples e importante da criopreservação é a necessidade de remover a maior parte da água das células antes que elas congelem (SEIDEL, 1988). No entanto para permitir que as células resistam a essa desidratação e ao frio, é necessário a utilização de soluções crioprotetoras. Os mecanismos de ação dos crioprotetores ainda são muito pouco entendidos e provavelmente variam com o crioprotetor utilizado.

Os crioprotetores podem ser divididos em penetrantes e não penetrantes. Exemplos de crioprotetores penetrantes incluem o

glicerol, DMSO, etilenoglicol e 1,2 propanediol. Todos eles são moléculas relativamente pequenas. Os não penetrantes incluem grandes açúcares como sucrose, trealose e rafinose, polímeros (PVP), proteínas e lipoproteínas. Frequentemente, gema de ovo, leite e soro sanguíneo são usados como crioprotetores por conterem essas moléculas (SEIDEL, 1988; RODRIGUES, 1992).

A sobrevivência dos embriões ao congelamento é influenciada pela taxa de adição do crioprotetor, duração da exposição antes do congelamento (WHITTINGHAM, 1980), velocidade de resfriamento (MAZUR, 1977), procedimento de descongelamento (SEIDEL, 1988), remoção do crioprotetor (RENARD *et al.*, 1982) e do grau de permeabilidade do embrião ao crioprotetor utilizado, o que é dependente do coeficiente de permeabilidade do embrião para o respectivo agente, o gradiente entre as concentrações intra e extracelular do crioprotetor, de temperatura e da área de superfície (WHITTINGHAM, 1980; SCHNEIDER e MAZUR, 1984; NIEMANN, 1991). Além disso, gametas e embriões de cada espécie e estágio de desenvolvimento embrionário apresentam suas próprias características de permeabilidade (WHITTINGHAM, 1980; NIEMANN, 1991, TAKAGI *et al.*, 1994, DOBRINSKY, 1996). Até o momento não existe um método de criopreservação eficiente e capaz de ser aplicado a todas as espécies (VAJTA *et al.* 2000), sendo necessária a adaptação do método de acordo com o tipo de estrutura e espécie de interesse.

No campo da reprodução animal, os métodos de criopreservação mais frequentemente utilizados são o congelamento convencional por cristalização e a vitrificação. A cristalização tem sido o método de escolha para sêmen e embriões produzidos *in vivo*. Esse método consiste no resfriamento lento das soluções (0,3 a 0,6 °C/min), as quais possuem baixas concentrações de crioprotetores penetrantes (1 a 2 M) (EROGLU *et al.*, 2002).

Diferentemente, a vitrificação requer altas taxas de resfriamento (15000-20000 °C/min) e elevadas concentrações (6-8M) de crioprotetores penetrantes (SHAW, 2000). A vitrificação consiste na transição de soluções aquosas do estado líquido para o estado vítreo (amorfo), ou seja, um estado com propriedades mecânicas de um sólido semelhante a um vidro, estado no qual não se formam cristais de gelo (CROWE e CROWE, 2000). Seus benefícios estão relacionados à redução de gastos, uma vez que dispensa equipamentos caros e sofisticados, agilidade no processo e simplificação de procedimentos, se comparados ao congelamento por cristalização, porém as altas concentrações de crioprotetores utilizadas elevam muito o potencial tóxico das soluções crioprotetoras (KULESHOVA *et al.*, 2002).

Atualmente, a vitrificação tem sido o método de escolha para criopreservação de ovócitos e embriões produzidos *in vitro*, principalmente após a introdução das OPS (palheta aberta estirada) como recipiente para envase dos ovócitos e embriões. Esse método permite reduzir o volume da solução de vitrificação (1,0µl), aumentar a velocidade de resfriamento para aproximadamente 20.000 C/ min, e assim reduzir a concentração de crioprotetores nas soluções de vitrificação, conseqüentemente, promovendo maiores taxas de viabilidade dos ovócitos após a desvitrificação (VAJTA *et al.*, 1998).

### Criopreservação de ovócitos

A criopreservação com estocagem de materiais biológicos a temperaturas muito baixas (ex: nitrogênio líquido a -196°C) é desejável por razões biológicas e comerciais, uma vez que pode reduzir os custos, riscos genéticos e transmissão de doenças que estão normalmente associados com a manutenção de animais vivos e linhagens celulares.

No entanto alterações de membranas celulares, cromossomos, DNA, citoesqueleto, função enzimática, ultraestrutura e zona pelúcida podem ocorrer quando as células são colocadas em temperaturas abaixo da temperatura corporal (SHAW *et al.*, 2000). Esses danos podem acontecer em qualquer segmento do processo de criopreservação.

Ao contrário dos espermatozoides e embriões, que são rotineiramente criopreservados com sucesso, ovócitos têm se mostrado extremamente sensíveis a baixas temperaturas (MEN *et al.*, 2002). O grande tamanho celular, sensibilidade do fuso meiótico e da zona pelúcida ao resfriamento, sua suscetibilidade para ativação partenogênica e danos pelo resfriamento, são fatores que afetam o congelamento e descongelamento do gameta feminino (NOWSHARI *et al.*, 1994, Shaw *et al.*, 2000).

O estágio de maturação ovocitária é um fator de grande impacto sobre os resultados da criopreservação dessas células (MEN *et al.*, 2002). Tentativas de vitrificar ovócitos bovinos imaturos não têm sido bem sucedidas. Ovócitos bovinos imaturos congelados em 1,8 M de etilenoglicol apresentaram taxa de fertilização *in vitro* significativamente menor que ovócitos maturados (OTOI *et al.*, 1995). Resultados semelhantes foram obtidos por IM *et al.* (1997), congelando ovócitos bovinos com propilenoglicol ou DMSO.

Destruição das junções comunicantes entre as células do *cumulus* e o ovócito normalmente ocorrem quando os ovócitos são criopreservados no estágio de vesícula germinativa, sendo essa alteração uma das principais causas da baixa taxa de sobrevivência ovocitária a criopreservação. Recentemente VIEIRA *et al.* (2002) vitrificaram ovócitos bovinos imaturos em OPS (VAJTA *et al.*, 1997) e obtiveram 6% de formação de blastocistos, além de descreverem o nascimento de bezerros saudáveis obtidos de blastocistos derivados de ovócitos imaturos vitrificados.

Diferentemente, ovócitos maturados podem sofrer danos durante o processo de criopreservação pela despolimerização de microtúbulos, o que interfere na organização do fuso meiótico, causando aumento na incidência de aneuploidia. Mudanças irreversíveis no fuso podem ocorrer já em temperaturas de 7°C abaixo da temperatura corporal (EROGLU *et al.*, 1998). Esses ovócitos também são susceptíveis a liberação prematura dos grânulos corticais, o que tem sido relacionado a menores taxas de fertilização (HOCHI *et al.*, 1998). MEN *et al.* (2002) obtiveram maior taxa de produção de blastocistos vitrificando ovócitos maturados, que aqueles em estágio de vesícula germinativa (8,37 e 1,06 %, respectivamente), utilizando a metodologia de OPS. Da mesma forma, diversas equipes têm apresentado resultados semelhantes de formação de blastocistos a partir de ovócitos maturados (MARTINO *et al.*, 1996; VAJTA *et al.*, 1997; HOCHI

*et al.*, 1998; VIEIRA *et al.*, 2002).

Outro importante fator que pode influenciar a sobrevivência de ovócitos bovinos a criopreservação é o método de congelamento. O tempo de equilíbrio, concentração do crioprotetor, procedimento de congelamento e diluição do crioprotetor são fatores determinantes para o sucesso da criopreservação celular (NOWSHARI *et al.*, 1994). Ultimamente a busca de crioprotetores menos tóxicos, como a trealose, tem sido tentado. Este dissacarídeo vem sendo utilizado como crioprotetor extracelular, na criopreservação de embriões (SAHA *et al.*, 1996); sêmen (AN *et al.*, 2001) e ovócitos (HASTENREITER, 2006).

Protocolos recentes de vitrificação são promissores, mas os resultados ainda são muito baixos para a utilização comercial desta técnica. São descritas taxas de formação de blastocistos oriundos de ovócitos vitrificados em torno de 10%, contra 40-45% dos controles não vitrificados (VAJTA *et al.*, 1997; PAPIS *et al.*, 2000) e taxas de nascimento de 15-20% (VIEIRA *et al.*, 2002). Esses resultados reforçam a necessidade de pesquisar fatores adicionais que afetam a sobrevivência de ovócitos bovinos submetidos a vitrificação, como forma de contornar a enorme sensibilidade do gameta feminino à criopreservação.

#### *Criopreservação de embriões*

A criopreservação de embriões tornou-se uma técnica integrante dos processos de transferência de embriões em bovinos na década de oitenta e atualmente sua importância é claramente evidenciada pelo grande número de embriões congelados e transferidos a cada ano.

A criopreservação tem grandes aplicações operacionais, pois permite a transferência de embriões conforme a disponibilidade de receptoras e a conveniência do criador (LÔBO, 1996).

O desenvolvimento de metodologias padronizadas de congelamento lento permitiu sua aplicação comercial em larga escala para embriões bovinos produzidos *in vivo*, originando taxas de gestação ligeiramente inferiores àquelas obtidas com embriões transferidos “a fresco”.

O método clássico para congelamento de embriões bovinos produzidos *in vivo* utiliza soluções crioprotetoras contendo glicerol 1,4 M, sendo esse crioprotetor adicionado em duas etapas. Após o descongelamento é necessária a remoção do crioprotetor antes da transferência embrionária, o que exige uma infra-estrutura mínima para tal procedimento (NIEMANN, 1991). A substituição do glicerol pelo etilenoglicol 1,5M (VOELKEL E HU, 1982) nas soluções crioprotetoras facilitou ainda mais a aplicação dessa técnica, sem alterar a taxa de prenhez. Por ser mais permeável aos embriões, o etilenoglicol pode ser adicionado em uma única etapa (método *one-step*) e não necessita ser removido após o descongelamento, permitindo a transferência direta dos embriões para o útero das receptoras.

Atualmente, os procedimentos de congelamento para mórulas e blastocistos bovinos coletados não cirurgicamente resultam em taxas de gestação de 50 % (LUCAS-HAHN, 1995). No entanto uma particularidade bastante importante quanto à

criopreservação de embriões bovinos diz respeito à taxa de gestação de embriões zebuínos congelados ser aproximadamente 20 % inferior aquela obtida com embriões taurinos congelados (ZANENGA, 1993). Embriões zebuínos apresentam graus de degeneração celular mais elevados que embriões taurinos congelados, possivelmente devido a diferenças ultraestruturais entre embriões taurinos (*Bos taurus*) e zebuínos (*Bos indicus*) (VISINTIN *et al.*, 2002). Esse fato assume uma grande importância no contexto nacional, visto que o Brasil possui uma população bovina estimada em 176 milhões de cabeças e, desse total, cerca de 80 % é constituída de zebuínos, compreendendo animais de raças puras, bem como os mais variados graus de mestiçagem (ACNB, 2005).

Atualmente o grande desafio neste campo tem sido a criopreservação de embriões produzidos *in vitro* (PIV). A elevada sensibilidade ao resfriamento e baixa congelabilidade desses embriões, quando comparadas aos produzidos *in vivo*, interfere na utilização comercial deste método e compromete a plena aplicação da produção *in vitro* de embriões bovinos (MASSIP, 2001).

Uma alternativa para criopreservar estes embriões é a vitrificação (BEGIN *et al.* 2003). Diversas metodologias têm sido testadas, utilizando diferentes suportes para envase dos embriões, com o objetivo de reduzir o volume da solução de vitrificação e assim aumentar a velocidade de resfriamento, o que permitir reduzir as elevadas concentrações dos crioprotetores penetrantes das soluções de vitrificação e assim diminuir o potencial tóxico dessas soluções.

O protocolo mais utilizado atualmente para a vitrificação de embriões PIV, é o que utiliza as OPS (palheta aberta estirada) como suporte para envase dos embriões (VAJTA *et al.*, 1997), permitindo alcançar taxas de gestação de aproximadamente 20-30% (DINNYÉS *et al.*, 1999; NEDAMBALE *et al.*, 2004). Porém ainda existe uma grande variação nos resultados, devido a enorme diversidade de combinações de sistemas de produção *in vitro* de embriões, principalmente na etapa de cultivo.

#### **Metodologia**

Para o desenvolvimento da presente investigação, foram consultadas todas as bases oficiais de biotecnologia reprodutiva e reprodução animal em nível global e nacional. A seleção de documentos correspondeu, em primeira instância, às referências oferecidas pelas fontes oficiais e posteriormente pelo rigor científico das mesmas, o anterior apoiado por ferramentas da teoria fundamentada, este desenho de pesquisa qualitativa tem sido utilizado para procurar novas técnicas nos processos biotecnológicos aplicados à reprodução.

#### **Conclusões e perspectivas**

A criopreservação tornou parte integrante da moderna pecuária, permitindo estocar sêmen e embriões para utilização em momento oportuno, porém ainda é necessário melhorar os resultados atuais, principalmente com relação a ovócitos e embriões produzidos *in vitro*. Nesse sentido é importante entender os fatores envolvidos na sensibilidade de gametas e embriões às baixas temperaturas, assim como desenvolver

métodos simples, rápidos e eficazes, que permitam o armazenamento dessas estruturas por longo tempo. Grandes avanços têm sido feitos com a vitrificação, porém ainda há necessidade de aumentar a repetibilidade dos resultados. O próximo desafio no campo da vitrificação é o desenvolvimento de métodos que permitam a transferência direta dos embriões, o que permitirá uma maior utilização dessa técnica.

### Literatura citada

- AN, T.Z., Iwakiri, M., EdashigE, K., Sakurai, T. y Kasai, M. (2001). Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 40, 237-249.
- Asada, M., Ishibashi, S., Ikumi, S. y Fukui, Y. (2002). Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 58, 1199-1208.
- Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyes, A., y Keefer, C. (2003). Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4- cell embryos using the cryoloop (clv) and solid-surface vitrification (ssv) methods. *Theriogenology*, 59, 1839-1850.
- Crowe, J.H., y Crowe, L. M. (2000). Preservation of mammalian cells- learning nature's tricks. *Nature. Biotechnology*, 18, 145-147.
- Dobrinisky, J.R. (1996). Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 45, 17-26.
- Dinnyés, A., Yang, X. Z., Li, X. L., Bagis, H., Presicce, G. A., Gasparrini, B., Neglia, G., Nagai, T., y Wilmut, I. (2001). Solid Surface Vitrification (SSV): An Efficient Method for Oocyte and Embryo Cryopreservation in Cattle. Abstracts of Papers at the Thirty-Eighth Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 332-333.
- Eroglu, A., Toth, T.L., y Toner, M. (1998). Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertility and Sterility*, 69, 944-957.
- Eroglu, A., Toner, M., y Toth, T.L. (2002). Beneficial effect of microinjected trealose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertility and Sterility*, 77(1), 152-156.
- Hastenreiter, G.P. (2006). Avaliação do efeito crioprotetor da trealose intracelular na vitrificação de ovócitos bovinos maturados *in vitro*. Campos dos Goytacazes. Monografia. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2006. 61p.
- Hochi, S., Ito, K., Hirabayashi, M., Ueda, M., Kimura, K., y Hanada, A. (1998). Effect of nuclear stages during IVM on the survival of vitrified-warmed bovine oocytes. *Theriogenology*, 49, 787-796.
- Im, K.S., Kang, J.K., Kim, y H.S. (1997). Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes. *Theriogenology*, 47, 881-891.
- Lôbo, R. B. (1996). Programa de Melhoramento Genético da raça Nelore. 3.ed. Ribeirão Preto: PMGRN. 104p.
- Lucas-Hahn, A. (1995). Cryopreservation of micromanipulated embryos. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 11, Belo Horizonte. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. p.102-109.
- Martino, A., SOngsasen, N., y Leibo, S.P. (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54(5), 1059-1069.
- Massip, A. (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals*, 36(2): 49–55.
- Mazur, P. (1977). Slow freezing injury in mammalian cells. In Elliott, K. & J. Whelan: The freezing of mammalian embryos (Ciba Foundation Symposium n° 52). Elsevier, Amsterdam, p.19-41.
- Men, H., Monson, R.L., y Rutledge, J.J. (2002). Effect of meiotic stage and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology*, 57(3), 1095-1103.
- Nedambale, T.L., Dinnyés, A., Groen, W., Dobrinisky, J.R., Tian, X.C. y Yang, X. (2004). Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSON or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 62(3-4), 437-449.
- Niemann, H. (1991). Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology*, 35(1), 109-124.
- Nowshari, M.A., Nayudu, P.L., y Hodges, J.K. (1994). Effect of cryoprotectant concentration, equilibration time and thawing procedure on survival and development of rapid frozen-thawed mature mouse oocytes. *Theriogenology*, 42(7), 1193-1204.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Suzuki, T. (1995). In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology*, 32(5), 455-460.
- Papis, K., Shimizu, M., y Izaike, Y. (2000). Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, 54(5), 651-658.
- Renard, J.P.; Heyman, Y.; Ozil, J.P. (1982). Congélation de l'embryon bovin: une nouvelle méthode de décongélation pour le transfert cervical d'embryons conditionnés une seule fois en paillettes. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 126, 23-32.
- Rodrigues, J.L. (1992). Aspectos da congelação de embriões bovinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 7, Jaboticabal, *Anais*. Jaboticabal, p.55-79.
- Saha, S., Rajamahendran, R., y BOENDIONO, A. (1996). Viability of bovine blastocyst obtained after 7,8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology*, 46(2), 331-343.

- Schneider, U., y Mazur, P. (1984). Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*, 21(1), 68-79.
- Seidel, G.E. (1988). Principles of cryopreservation of cells. In: *Techniques For Freezing Mammalian Embryos*. Colorado , *Proceedings*. Colorado, Colorado State University, p.6-13.
- Shaw, J.M., Oranratnachai, A., y Trouson, A.O. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53(1), 59-72.
- Takagi, M., Otoi, T., Boediono, A., Saha, S., y Suzuki, T. (1994). Viability of frozen-thawed bovine IVM/IVF embryos in relation to aging using various cryoprotectants. *Theriogenology*, 41(4), 915-921.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., y Callessen, H. (1998). Open pulled straw (OPS): vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction Development*, 51(1), 53-58.
- Vajta, G., Booth, P.J., Greve, T., y Callessen, H. (1997). Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters*, 18(3), 191-195.
- Vajta, G. (2000). Criopreservação de ovócitos e embriões produzidos *in vitro*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 15, Rio Quente-GO, 2000. *Arquivos da Faculdade de Veterinária*, UFRGS, Porto Alegre, v.28 p.85-94 (supl.).
- Viana, J.H.M. (2005). A produção mundial de embriões em 2004. *O embrião*, 25, 4-5.
- Vieira, A.D., Mezzalira, A., Barbieri, D.P., Lehmkuhl, R.C., Rubin, M.I.B., y Vajta, G. (2002). Calves Born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, 45(1), 91-94.
- Visintin, J.A., Martins, J.F.P., Bevilacqua, E.M., Mello, M.R.B., Nicácio, A.C., y ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. (2002). Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: Are they really different? *Theriogenology*, 57(1), 345-359.
- Voelkel, S.A., y Hu, Y.X. (1992). Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology*, 37(3), 687-697.
- Whittingham, D.G. (1980). Principles of embryo preservation. In Ashwood-Smith: *Low temperature preservation in medicine and biology*. Pitman Medical I, London, 65-83.
- Wilmot, I. y Rowson, L.E.A. (1973) Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 92(26), 686-690.
- Zanenga, C.A. Congelamento de embriões em zebuínos, evolução e viabilidade. In: Congresso Brasileiro dx Reprodução Animal, 10, Belo Horizonte, 1993. *Anais. Belo Horizonte. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, p.125-130.