

VITRIFICAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS COM A UTILIZAÇÃO DE MICROPIPETAS DE VIDRO OU PALHETAS ESTIRADAS

BOVINE OOCYTE VITRIFICATION WITH GLASS MICROPIPETES OR OPEN PULLED STRAW

Alceu Mezzalira¹; Arnaldo Diniz Vieira²; Fabiano Buss Cruz³;
Dilmar Paulo Barbieri⁴; Juliana Cardoso Damiani⁴

RESUMO

Com o objetivo de avaliar diferentes formas de envase no processo de vitrificação, complexos *cumulus oophorus* (CCOs) obtidos de folículos entre 2 e 8mm foram divididos aleatoriamente em três grupos e submetidos a maturação em TCM 199 sais de Earle com 10% de soro de égua em estro (SEE), em estufa a 39°C, com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Com 22 horas de cultivo os grupos a serem vitrificados foram submetidos a pipetagens sucessivas para o desnudamento parcial, em uma placa contendo meio de manutenção (TCM-Hepes com 10% de soro fetal bovino - SFB), sendo então expostos a uma solução de equilíbrio composta por 400µl de meio de manutenção, adicionado de 50µl de EG e 50µl de DMSO, por 30 segundos. Em seguida foram transferidos para a solução de vitrificação composta por 300µl de uma solução de sacarose 0,8M em TCM-Hepes com 20% SFB, acrescido de 100µl de EG e 100µl de DMSO, envasados em grupos de cinco, em micropipetas de vidro (MV T1) ou palhetas estiradas (OPS T2) e vitrificados. O reaquecimento foi realizado pela imersão direta das MV e OPS numa solução de Sacarose 0,3M em meio de manutenção, a 37 –

38°C, onde os CCOs permaneceram por cinco minutos, quando foram transferidos para uma solução com 0,15M de sacarose por mais cinco minutos, antes de retornarem para o meio de manutenção. A seguir os ovócitos dos dois grupos retornaram ao meio de maturação por mais duas horas. A partir de então, todos os grupos foram submetidos aos mesmos procedimentos de fecundação e cultivo. Para a fecundação utilizou-se sêmen selecionado pelo processo de migração ascendente (swim-up), em meio TALP-SPERM, utilizando-se uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/ml. A incubação dos ovócitos com espermatozoides foi realizada por 18 – 22 horas, em 400µl do meio TALP-FERT, adicionado de 30µg/ml de heparina. O cultivo foi realizado em SOFaaci, sendo avaliadas as taxas de clivagem e blastocistos. Observou-se uma taxa de

clivagem de 55,5, 54,6 e 78,6% para os tratamentos MV, OPS e Controle, respectivamente. A taxa de blastocistos foi 10,0 e 7,9% para os tratamentos MV e OPS, respectivamente, que não diferiram entre si ($p>0,05$) e foram inferiores ($p<0,05$) aos 42,8% do tratamento controle. Os resultados deste estudo demonstram que as micropipetas de vidro estiradas podem ser utilizadas na vitrificação de ovócitos bovinos, proporcionando resultados semelhantes aqueles obtidos com as palhetas estiradas.

PALAVRAS-CHAVE: vitrificação, OPS, ovócitos bovinos, micropipetas.

SUMMARY

To evaluate the effect of different embryo containers in vitrification procedure, oocytes obtained from 2 to 8mm size follicles were randomly allocated in three groups and submitted to maturation in TCM 199 Earle salts medium with 10% of estrus mare serum (SEE), at 39°C, with 5% CO₂ atmosphere and 95% of relative humidity. After 22 hours of culture, two groups were submitted to a partial remove of cumulus cells by successive pipeting in a maintenance medium (TCM-Hepes + 10% fetal calf serum) and then exposed to an equilibrium solution with 50µl of EG and 50µl of DMSO in 400µl of maintenance medium, for 30 seconds. After that, they were transferred to a vitrification solution composed by 300µl of 0.8M sucrose solution in TCM-Hepes with 20% of fetal calf serum, added with 100µl of EG and 100µl of DMSO, and loaded in groups of five, in glass micropipetes (MV-T1) or pulled straws (OPS-T2) and vitrified. The warming was performed by direct immersion of MV or OPS in a 0.3M Sucrose solution in maintenance medium, at 37 - 38°C, during five minutes. The oocytes were then transferred to a 0.15M sucrose solution (five minutes) and then to a maintenance medium. Then, the oocytes of both groups returned to the maturation medium for an additional two hours culture period. All groups were then submitted to the

¹ Professor doutor, - Departamento de Clínica e Patologia. Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV Av. Luís de Camões 2090 – 88520-000 Lages SC E-mail mezzalira@cav.udesc.br

² Professor, mestre – Departamento de Clínica e Patologia – UDESC / CAV Lages SC

³ Acadêmico – Medicina Veterinária – CAV/UDESC, Bolsista de Iniciação Científica do PROBIC/CNPq

⁴ Acadêmicos – Medicina Veterinária – Estagiários Laboratório de Reprodução Animal – UDESC / CAV

same fertilization and culture procedures. Fertilization was performed with 1×10^6 spermatozoa/ml, selected by swim-up procedure, and the incubation of oocytes / spermatozoa was performed in 400 μ l of TALP-FERT medium with 30 μ g/ml of heparin, during 18–22 hours. The culture was performed in SOFaaci. The cleavage rate of 55.5%, 54.6% and 78.6% was observed in the treatments MV, OPS and Control, respectively. The blastocyst rate was 10.0 and 7.9% for the MV and OPS treatments, respectively. There was not significant differences between treatments ($p>0.05$) and both were inferior ($p<0.05$) to the Control, 42.8%. These results demonstrated that the glass micropipetes could be used in the bovine oocyte vitrification, providing similar results than those obtained with the OPS.

KEY WORDS: vitrification, OPS, bovine oocytes, micropipetes.

INTRODUÇÃO

A criopreservação de ovócitos bovinos proporciona a criação de bancos de recursos genéticos, permitindo o uso futuro em diversas biotecnologias, além de possibilitar um melhor planejamento da produção *in vitro* de embriões. No entanto, atualmente os resultados obtidos com ovócitos criopreservados são em geral muito baixos, com poucos atingindo os estágios de desenvolvimento adequados para transferência, não sendo assim comercialmente atrativos. Estes baixos índices são decorrentes da alta sensibilidade destas estruturas ao resfriamento, o que é determinado por características próprias como o tamanho, o inter-relacionamento com as células da corona radiata, a funcionalidade e o posicionamento de organelas, o alto teor lipídico e o coeficiente de permeabilidade de sua membrana. Estes fatores por sua vez, são diretamente influenciados pelo estágio de desenvolvimento e qualidade das estruturas. Assim, o grande tamanho, o elevado conteúdo lipídico e o complexo citoesqueleto, tem determinado uma baixa sobrevivência dos ovócitos ao protocolo normalmente utilizado na criopreservação de embriões, e que pressupõe uma curva de resfriamento de 0,3 a 0,6°C por minuto, até -30 ou -35°C, seguida da imersão em nitrogênio líquido.

Com a obtenção dos primeiros blastocistos provenientes de ovócitos criopreservados (LIM et al., 1991,1992), muitos dos pontos críticos da metodologia foram identificados. Estudos realizados por ARAV et al. (1993) confirmaram uma influência negativa, tempo dependente, da exposição de ovócitos a temperaturas inferiores a 20°C, demonstrando a necessidade de uma rápida passagem por essa faixa térmica, durante a criopreservação. O simples resfriamento, mesmo antes da congelação, provoca lesões na membrana plasmática e na estrutura citoesquelética dos ovócitos, determinando danos irreversíveis, que coincidem com a fase de transição

térmica dos lipídios de membrana (ARAV et al., 1996).

Na busca de metodologias que proporcionem sobrevivência aos ovócitos, grande número de investigações foram direcionadas para métodos alternativos de criopreservação, especialmente o congelamento ultrarrápido e a vitrificação, que possibilitam uma passagem rápida pela zona crítica de temperatura (PALLASZ & DEL CAMPO, 1995).

A vitrificação é um processo termodinâmico no qual o aumento da viscosidade determina que os fluídos crioprotetores adquiram propriedades mecânicas de um sólido amorfo semelhante ao vidro, porém mantendo as propriedades do líquido, prevenindo a formação de cristais de gelo. O sucesso da vitrificação está relacionado com a capacidade de permeação do crioprotetor, a concentração, o tempo de exposição e o volume, que devem ser adequados para impedir a formação de cristais de gelo intracelular, sem no entanto produzir lesões osmóticas ou tóxicas. Isto foi obtido pela primeira vez quando RALL & FAHY (1985) vitrificaram com êxito embriões de camundongos.

Muito embora estes métodos tenham proporcionado resultados satisfatórios com ovócitos de roedores, em bovinos os resultados são ainda pobres. MARTINO et al. (1996) obtiveram desenvolvimento até blastocistos de ovócitos bovinos congelados em grades de microscopia eletrônica (grids) mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido. Os autores consideram que a velocidade extremamente rápida de congelamento, obtida com a metodologia, permite a sobrevivência dos ovócitos e que esta velocidade não pode ser obtida quando se utiliza uma palheta normal no congelamento. VAJTA et al. (1997) demonstraram que a vitrificação em palhetas estiradas e abertas (Open Pulled Straws - OPS) permite a sobrevivência de embriões produzidos *in vitro*, possivelmente por aumentar a velocidade de congelamento e descongelamento, minimizando desta forma as injúrias durante a criopreservação. A metodologia foi adequada para a utilização com ovócitos, (VAJTA et al. 1998) permitindo a obtenção de resultados entre 7 e 13% de blastocistos. O diâmetro das palhetas utilizadas no método OPS (0,87mm) é bastante superior ao das micropipetas de vidro estiradas (0,35mm). Desta forma, as micropipetas devem proporcionar maior velocidade de congelamento, além de facilitar o manuseio dos ovócitos, realizado com elas próprias. Com a vitrificação de ovócitos bovinos em micropipetas de vidro, MEZZALIRA et al. (1999) obtiveram 100% de recuperação, 100% de sobrevivência pós descongelamento e 29,4% de clivagem após 24 horas de cultivo. Estes dados demonstram a viabilidade da

técnica e a necessidade de novas investigações que possibilitem sua adequação para a obtenção de índices satisfatórios de desenvolvimento embrionário, após descongelamento.

A adequação de um protocolo de criopreservação de ovócitos possibilitará um maior aproveitamento do material genético existente em nossos rebanhos, o que atualmente não vem acontecendo pela inexistência de uma metodologia definida que proporcione, resultados economicamente satisfatórios.

O presente estudo teve a finalidade de comparar a viabilidade de ovócitos bovinos maturados, vitrificados com a utilização de micropipetas de vidro ou palhetas estiradas.

MATERIAL E MÉTODOS

Ovários bovinos obtidos em frigoríficos e transportados ao laboratório em solução fisiológica 0.9% de NaCl a temperatura de 28 - 35°C tiveram os folículos de 2 a 8mm de diâmetro aspirados com um scalp 19G conectado a um tubo de ensaio mantido a 30°C, ligado a uma bomba de vácuo com pressão de 20 mmHg. A seleção das estruturas foi realizada em líquido folicular (LF), sob estereomicroscópio. Após a seleção, os CCOs foram aleatoriamente divididos em três grupos, constituindo os respectivos tratamentos. Os ovócitos foram então transferidos para 400µl de meio de maturação composto por TCM 199 sais de Earle (Cultilab), com 5,96mg/ml de HEPES (Sigma H 6147), 2,2mg/ml de NaHCO₃, 2,2µg/ml de piruvato de sódio, 0,01UI de rFSH/ml (Serono; L1930300), 0,5µg/ml LHb (USDA; AFP-11743-B)], com 10% de soro de égua em estro (SEE) (FIGUEIRÓ, et al. 2000), acondicionados em placas de quatro poços (Nunc A/S; Cat.176740), sendo incubados a 39,0°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Com 22 horas de cultivo os grupos a serem vitrificados foram transferidos para uma placa contendo meio de manutenção composto por TCM- 199 sais de Earle, adicionado de 6,5mg/ml de HEPES sais de sódio (Sigma H 7006), 0,42mg/ml de NaHCO₃ (Sigma S 4019) e 2,2µg/ml piruvato de sódio (Sigma; P 4562) + 10% de soro fetal bovino (SFB) e submetidos a um desnudamento parcial pela utilização de

pipetagens sucessivas, sendo então expostos a uma solução de equilíbrio composta por 400µl de meio de manutenção, adicionado de 50µl de EG (Sigma E 9129) e 50µl de DMSO (Sigma D 5879), por 30 segundos. Em seguida, foram transferidos para a solução de vitrificação composta por 300µl de uma solução de sacarose 0,8M em meio de manutenção com 20% de SFB, adicionado de 100µl de EG e 100µl de DMSO, permanecendo nesta solução por 20 a 25 segundos, período no qual foi realizado o envase.

Para a vitrificação, grupos de cinco ovócitos foram envasados em micropipetas de vidro (MV-T1) ou palhetas estiradas (OPS-T2) e mergulhadas em nitrogênio líquido. As micropipetas de vidro foram confeccionadas pelo aquecimento e estiramento de tubos de vidro (micro-hematócrito) até se obter um diâmetro interno próximo a 0,35mm, enquanto as OPS foram adquiridas (Szigta Ltd, Melbourne, Australia).

O reaquecimento foi realizado pela imersão direta das palhetas estiradas / micropipetas em 800µl de uma solução de reaquecimento (0,3M Sacarose em meio de manutenção) a 37°C, onde os CCOs permaneceram por cinco minutos, quando foram transferidos para solução com 0,15M de sacarose por mais cinco minutos, antes de retornarem para o meio de manutenção. Após o reaquecimento, os ovócitos dos dois grupos retornaram ao meio de maturação, sendo mantidos em estufa por mais duas horas para completar as 24 horas de maturação. Completada a maturação, os dois grupos tratados e o grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos de fecundação e cultivo.

Para a fecundação utilizou-se sêmen congelado, proveniente de um touro testado para FIV, sendo os espermatozoides selecionados pelo processo de migração ascendente (Swim-up), em meio TALP-SPERM, utilizando-se uma concentração final de 1×10^6 espermatozoides/ml. A fecundação foi realizada pela incubação dos ovócitos com espermatozoides por 18 – 22 horas, em 400µl do

meio TALP-FERT, adicionado de 30µg/ml de heparina (Sigma H 3393), em placas de quatro poços, nas mesmas condições de cultivo já descritas

Após a fecundação, os prováveis zigotos foram transferidos para uma placa NUNC com 800µl de TCM Hepes + 10% SEE, onde realizou-se a remoção das células do *Cumulus oophorus*, mediante fluxo leve produzido por pipetador de 1000µl. Em seguida, os prováveis zigotos foram submetidos a 3 banhos em meio de cultivo (SOF), acondicionados em placas de quatro poços com 400µl de SOFaaci (HOLM et al., 1999), sob óleo mineral (Sigma, M 8410), e incubados a 39°C em estufa de cultivo com atmosfera de 5% CO₂ até a avaliação da taxa de clivagem, realizada 48 horas após a inseminação. A partir de então utilizou-se uma bolsa impermeável à gases contendo uma atmosfera de 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, com umidade saturada, no período de cultivo restante. As bolsas foram mantidas em estufa de cultivo (Heraeus – Alemanha), para manter a temperatura. A segunda avaliação foi realizada em D8, sendo considerados viáveis os embriões que atingiram o estágio de blastocisto.

Foram realizadas 10 repetições, sendo os dados percentuais submetidos à análise de variância, utilizando-se o PROC GLM do SAS. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Não foram observadas diferenças significativas (P>0,05) entre os tratamentos que, todavia, foram inferiores ao controle não vitrificado (78,6%). A sobrevivência ao processo de vitrificação, evidenciada pelos percentuais de clivagem (Tabela 1) obtidos no tratamento MV-T1 55,5% e OPS-T2 54,6% são semelhantes aos 47 e 50% de clivagem obtidos por Vajta et al. (1998), aos 54,5% de sobrevivência obtidos por HURT et al. (1999) e aos 55,0% obtidos por MEZZALIRA et al (2002) com idêntica metodologia. HOCHI et al (2001) determinaram a velocidade de congelamento e reaquecimento para diversos diâmetros de micropipetas de vidro durante a vitrificação. Quando o diâmetro externo destas micropipetas tem 440mm, a velocidade de resfriamento durante a vitrificação chega a 12.000°C/min. e uma velocidade de reaquecimento de 62.000°C/min. O diâmetro das micropipetas utilizadas neste estudo é muito próximo aos das micropipetas utilizadas pelo autor, supondo-se que as velocidades de resfriamento e reaquecimento, são também semelhantes. Os resultados obtidos com a otimização dos diferentes tratamentos avaliados por HOCHI et al (2001) proporcionaram uma taxa de clivagem estimada em 54,5%, que é idêntica às obtidas neste estudo (55,5 e 54,6%) para os tratamentos MV e OPS, respectivamente. Ao final do processo de fecundação, os ovócitos com lesões severas sofridas na vitrificação eram facilmente identificados, sendo a manifestação mais comum a contração do citoplasma e a coloração palha amarelada, também descritos por MARTINO et al. (1996), além de casos esporádicos de fratura de zona pelúcida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 01 – Índices de desenvolvimento de embriões derivados de ovócitos vitrificados com a utilização de micropipetas de vidro (MV) ou com palhetas estiradas (OPS)

Tratamentos	Ovócitos	Clivados		Embriões/clivados		Embriões/ Total %
	n	n	%	n	%	
MV	200	111	55,5	20	18,0 ^a	10,0 ^a
OPS	203	111	54,6	16	14,4 ^a	7,9 ^a
CONTROLE	336	264	78,6	144	54,5 ^b	42,8 ^b
TOTAL	739	486	65,7	180	-	-

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey 5%.

Na avaliação em D8, as taxas de blastocistos observadas no tratamento MV, 10,0% e no tratamento OPS, 7,9% não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$), muito embora sejam inferiores aos 13,0% (VAJTA et al., 1998). Entretanto, utilizando a mesma metodologia, porém com glicerol e etileno glicol como crioprotetores, LE GAL & MASSIP (1998) obtiveram 45,0% de clivagem no controle e apenas 7,9% no grupo vitrificado, resultados bastante inferiores aos obtidos no presente experimento, o que demonstra a necessidade de novas investigações que possibilitem melhorar os resultados e diminuir sua variabilidade. Quando o desenvolvimento embrionário foi avaliado considerando apenas os ovócitos que clivaram, as taxas de blastocistos em D8 foram de 18,0% para MV-T1 e 14,4% para OPS, que não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$). Estes índices são bastante inferiores aos 54,5% obtidos no grupo controle, nas mesmas condições. Isto demonstra que mesmo sobrevivendo ao processo de vitrificação e clivando, muitos zigotos perdem a capacidade de desenvolvimento até estágios mais tardios. Além dos danos determinados pelo próprio processo, é possível que uma série de fatores tenham influência nas taxas de desenvolvimento embrionário após a vitrificação de ovócitos. O desnudamento parcial, necessário à permeação dos crioprotetores em ovócitos maturados, é um fator que pode exercer grande influência. MEZZALIRA et al. (2002) observaram que o desnudamento parcial de ovócitos bovinos não resfriados, efetuado com 22 horas de maturação, determinou uma redução na taxa de blastocistos de 30 para 21%, demonstrando sua ação nociva. VAJTA et al. (1998) observaram um aumento na taxa de blastocistos de 13% para 25%, quando o desnudamento passou de 22 para 6 horas após o início da maturação, antes da vitrificação de ovócitos bovinos maturados. Fica claramente demonstrado que uma série de fatores podem influenciar nos índices obtidos após a vitrificação de ovócitos bovinos, sendo necessários novos estudos para sua avaliação.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que as micropipetas de vidro estiradas podem ser utilizadas na vitrificação de ovócitos bovinos, proporcionando resultados semelhantes aqueles obtidos com as palhetas estiradas, possibilitando facilidade de manuseio e rapidez na execução do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAV, A.; SHERU, D.; MATTIOLI, M. Osmotic and

cytotoxic Study of Vitrification of Immature Bovine Oocytes. **J. of Repr. and Fert.**, v.99, p. 353-358, 1993.

ARAV, A.; ZERON, Y.; LESLIE, S.B.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G.B.; CROWE, J.H. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v.33, n.6, p. 589-599, 1996.

FIGUEIRÓ, G.M., BRUM, D.S., MEZZALIRA, A., FIALHO, S.S., ALVES, M.R.L., RUBIN, M.I.B. E SILVA, C.A.M. Soro eqüino na PIV de embriões bovinos: análise do soro de égua em diferentes estágios do cio. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v.28, n.1, p.258, 2000 (Supl.).

HOCHI, S.; AKIYAMA, M.; MINAGAWA, G.; KIMURA, K.; HANADA, A. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro matured bovine oocytes. **Cryobiology**, v.42, n.1, p.69-73, 2001

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa Medium supplemented with Sodium Citrate and Myo-Inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, p.683-700, 1999.

HURT, A.E.; SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.Jr. Vitrification of equine and bovine oocytes in na ethylene glycol, ficoll and sucrose using open pulled straws. **Theriogenology**, v.51. n.1, p.166, 1999. Abstract.

Le GAL, F.; MASSIP, A. Development of thawed oocytes fertilized *in vitro* after vitrification by the Open Pulled Straw method before or after *in vitro* maturation. In: **Gametes: Development and Function**, Lauria, A; Gandolfi, F. Editors, Milano,1998, p.554.

LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.35, n.6, p.1225-1235, 1991.

LIM, J.M.; FUKUI, Y.; ONO, H. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.37, n.2, p.351-361, 1992.

MARTINO, A.; POLLARD J.W.; LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Mol. Reprod. Dev.**, v.45, p.503-512, 1996.

MEZZALIRA, A; BARBIERI, D. P.; MULLER, F.; PINHO, C. C.; SILVA, C.A.M.; RUBIN, M.I.B.;

BERNARDI, M.L. Vitriificação de oócitos bovinos em micropipetas de vidro. **Arq.Fac.Vet. UFRGS**, v.27, n.1, p.262, 1999.

MEZZALIRA, A.; VIEIRA, A.D.; BARBIERI, D.P.; MACHADO, M.F.; THALER NETO, A.; BERNARDI, M.L.; MONDINO, C.A.; RUBIN, M.I.B. Vitriificação de oócitos e embriões bovinos produzidos in vitro e expostos a citocalasina B. **Brazilian Veter. Journal**, (aceito p/public), 2002

PALASZ, T.A. & DEL CAMPO, M. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Recent advances. In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES- BIOTECNOLOGIA E TECNOLOGIAS AVANZADAS,...**Anais**.. Montevideo, 4-5 maio 1995, p.78-85, 1995.

RALL, W. F., & FAHY, G. M. Ice-free criopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Letters to Nature**, v.313, p.573-575, 1985.

VAJTA, G; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo Letters**, v.18, p.191-195, 1997.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification of cattle oocytes. **Theriogenology**, v.49, n.1, p.176, 1998. Abstract.