

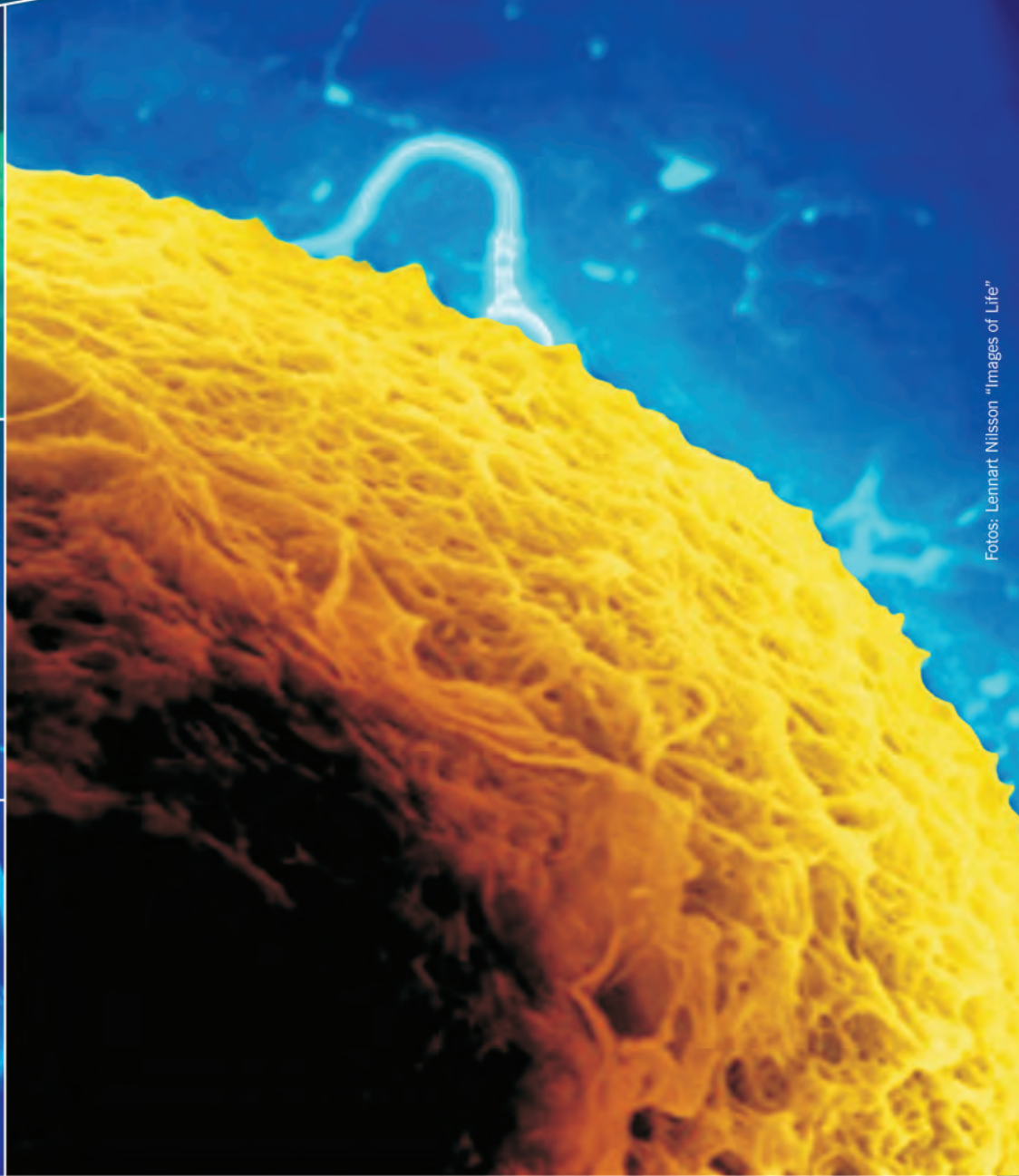
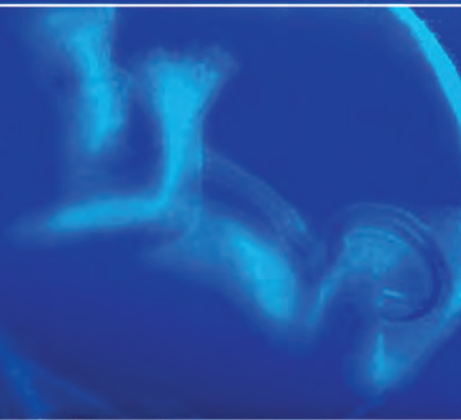
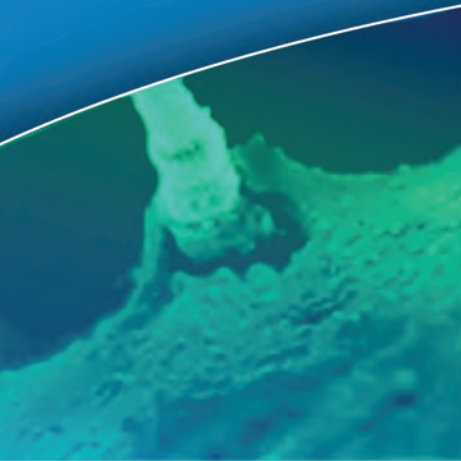
Volume 15
Number 4
Jul-Aug 2011
ISSN 1517-5693

JBRA

Assisted Reproduction



JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA



Fotos: Lennart Nilsson "Images of Life"

Avaliação dos Resultados de Vitrificação de Blastocistos

Outcome of Blastocysts Vitrification

Ana Márcia de Miranda Cota¹, Elisa Lopes e Lages², Hérica Cristina Mendonça¹, Ana Luísa Menezes Silva², Maria Clara Magalhães dos Santos Amaral¹ e João Pedro Junqueira Caetano³

¹Membro do corpo clínico da Clínica Pró-Criar / Mater Dei

²Bióloga da Clínica Pró-Criar / Mater Dei

³Diretor da Clínica Pró-Criar / Mater Dei

Clínica Pró-Criar / Mater Dei

Apresentado como Poster no X Congresso Geral da Rede Latinoamericana de Reprodução Assistida, RJ.

RESUMO

Objetivo: avaliar os resultados da técnica de vitrificação para o congelamento de blastocistos humanos, na Clínica Pró Criar.

Métodos: Foi realizado um estudo observacional, retrospectivo e descritivo, onde foram avaliados os prontuários das pacientes que se submeteram a um ciclo de congelamento e descongelamento de blastocistos vitrificados durante o período de janeiro/2007 a maio/2010.

Resultados: Foram avaliados 292 ciclos de congelamento e descongelamento de blastocisto, sendo que a idade média das mulheres foi de 34,35 anos. O número médio de blastocistos vitrificados/desvitrificados por paciente foi de $2,08 \pm 0,87$, totalizando 604 blastocistos descongelados. Desses embriões descongelados, 482 blastocistos sobreviveram, sendo a taxa de sobrevivência do blastocisto de 80%. Nos 269 ciclos em que houve transferência, uma média de $1,63 \pm 0,77$ blastocistos foram transferidos por paciente. Das 292 pacientes, 57,53% tiveram os blastocistos congelados no dia 5 e 42,47% tiveram o congelamento no dia 6. A taxa global de gravidez por ciclo de descongelamento foi de 44,5% e a taxa de gravidez clínica por transferência foi 48%. Quando realizada a comparação dos resultados segundo o dia de congelamento (dia 5 x dia 6) não foi encontrado diferença significativa em relação à taxa de gravidez.

Conclusão: Pode-se concluir que o método de vitrificação de blastocistos é uma técnica eficiente, com altas taxas de sobrevivência, possibilitando o armazenamento dos embriões excedentes com boas taxas de gravidez em ciclos de descongelamento.

Palavras-Chaves: vitrificação, blastocisto, congelamento

ABSTRACT

Objective: to evaluate the results of the vitrification of human blastocyst in the Clinic Pró Criar / Mater Dei.

Materials and Methods: It is an observational, retrospective and descriptive study. 292 patients who had submitted a frozen-thawed blastocyst cycle during the period of January of 2007 the May of 2010 had been evaluated.

Results: The mean age of the women was 34,35 years. The mean number of vitrified and defrosted blastocyst for patient was $2,08 \pm 0,87$, totalizing 604 defrosted blastocyst. 482 blastocyst had survived, with a survival rate of 80%. The average number of blastocyst trans-

ferred was $1,63 \pm 0,77$. 57,53% patients had had the blastocysts frozen in Day 5 and 42,47% in Day 6. The global pregnancy rate for thawed cycle was 44,5%. The clinical pregnancy rate for transfer was 48%. There was no statistical difference in pregnancy rate when Day 5 and Day 6 were compared.

Conclusion: the vitrification of blastocyst is an efficient technique, with high survival rate, that allows the storage of the exceeding embryos with a high pregnancy rate in thawed cycles.

Keywords: vitrification, blastocyst, cryopreservation

INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas houve um grande avanço na área de criobiologia, principalmente no que se refere ao congelamento de embriões (Fuller and Paynter, 2004). Isso ocorreu devido a uma grande demanda na área de reprodução assistida sobre o destino dos embriões excedentes. Como não é possível transferir todos os embriões gerados devido ao risco de gestação múltipla e, eticamente não se descarta embriões viáveis, o armazenamento desses embriões excedentes se faz necessária. A criopreservação possibilita uma solução para esse problema, e também permite outras tentativas de gravidez com somente um ciclo de indução e punção folicular. Outra vantagem do programa de congelamento de embriões é reduzir os riscos da síndrome do hiperestímulo ovariano (SHO), através da não transferência dos embriões à fresco nesse ciclo, congelando-os para uma transferência futura (Michelmann and Nayudu, 2006). Assim, o congelamento de embriões permite um aprimoramento e um aumento na segurança das técnicas de reprodução assistida, se tornando uma estratégia terapêutica de extrema importância nas clínicas de reprodução assistida

O primeiro relato de congelamento de embriões de mamífero bem sucedido foi em 1972 (Whittingham et AL., 1972, Wilmut, 1972). Os primeiros nascimentos de crianças originadas de embriões congelados ocorreram em 1983 e 1984 (Trounson and Mohr, 1983, Zeilmaker et AL., 1984) já tendo nascido inúmeros bebês, em todo o mundo, decorrentes desse procedimento (Choi et al., 2000, Yokota et AL., 2001, Mukaida et AL., 2001, Vanderzwalmen et AL., 2002, Son et al., 2003).

Outro grande desafio na reprodução assistida é a tentativa de se minimizar a incidência de gestação múltipla secundária.

dária aos tratamentos. Assim, nas técnicas de fertilização *in vitro*, têm-se tentado cada vez mais a transferência de um embrião único (Dare et al., 2004). E a forma para se conseguir isso é a transferência de embriões no estágio de blastocisto, pois assim, há uma melhor seleção embrionária. Normalmente, a transferência dos embriões ocorre no estágio de clivagem. No entanto, o genoma do embrião só é ativado após o terceiro dia do seu desenvolvimento. Assim, quando se adia a transferência dos embriões para o quinto dia (estágio de blastocisto) há uma melhor seleção dos embriões, pois há a transição do genoma materno para o embrionário, o que permite uma melhor avaliação e a transferência de um menor número de embriões (Rijinders and Jansen, 1998).

Há basicamente duas técnicas de criopreservação de blastocistos: congelamento lento e a vitrificação. O congelamento lento é a técnica mais utilizada para a criopreservação de embriões, principalmente para os embriões no estágio de clivagem. No entanto, esse método não é tão eficiente para a criopreservação de blastocisto. Os blastocistos congelados pela técnica lenta apresentam uma baixa taxa de sobrevivência (Yeoman et al., 2001), o que fez com que a transferência desses embriões não fosse utilizada rotineiramente pelas clínicas de reprodução.

No entanto, hoje com o desenvolvimento da vitrificação essa situação vem sendo modificada. A vitrificação é uma técnica mais eficiente, rápida, segura e barata para armazenar os embriões (em qualquer estágio de desenvolvimento) (Kuwayama et al., 2005, Stehlik et al., 2005). Desta forma, a vitrificação vem substituindo por completo o congelamento lento (Mukaida et al., 2004, Huang et al., 2005, Vatja, 2006, Liebermann and Tucker, 2006, Stachecki et al., 2008).

O objetivo desse estudo é avaliar os resultados da técnica de vitrificação para o congelamento de blastocistos.

MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo e descritivo desenvolvido na Clínica Pró Criar/Mater Dei, onde foram avaliados os prontuários de 292 pacientes que se submeteram a um ciclo de congelamento e descongelamento de blastocistos vitrificados segundo a técnica de S³ Vitrification durante o período de janeiro/2007 a maio/2010. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Mater Dei.

Para o congelamento, os embriões que alcançassem no 5º ou 6º dia o estágio de blastocisto eram classificados de acordo com a sua morfologia segundo os critérios de Gardner e colaboradores (Gardner et al., 2000):

1. blastocisto inicial: apresenta pequena cavidade que ocupa menos de 50% do volume total do embrião.
2. blastocisto: apresenta blastocele que representa, pelo menos, 50% do volume total do embrião (aqui, o trofocotoderma e a massa celular interna são bem definidos).
3. blastocisto expandido: a blastocele preenche todo o embrião.
4. blastocisto totalmente expandido: apresenta blastocele totalmente expandida, o que resulta no aumento do diâmetro do embrião em relação ao seu tamanho inicial e um afinamento da zona pelúcida.
5. blastocisto em eclosão: observa-se o trofocotoderma eclodindo através da zona pelúcida.
6. blastocisto eclodido: blastocisto completamente fora da zona pelúcida.

Apenas os blastocistos excedentes que apresentassem a blastocele bem formada, trofocotoderma e massa celular interna bem distintos no 5º ou 6º dia eram então vitrificados pela técnica S³ Vitrification (Stachecki et al., 2008). A técnica consiste em 3 etapas onde o embrião passava

por uma série de 3 soluções compostas por meio PBS (Phosphate-buffered saline solution, Gibco) suplementado com albumina sérica humana (HSA, Irvine) e com crioprotetores penetrantes (ou permeáveis), glicerol (Sigma) e etileno glicol (Sigma) em concentrações crescentes. Os embriões eram expostos à primeira solução por 5 minutos, depois transferidos para a segunda solução por mais 5 minutos e, finalizando na terceira solução, onde imediatamente eram colocados em uma palheta (0,25 cc) que era selada termicamente nas duas extremidades. Uma vez carregadas e seladas, as palhetas eram resfriadas sob vapor de nitrogênio à uma temperatura de -100°C por 2 minutos antes de serem submersas em nitrogênio líquido. Na desvitrificação, as palhetas, imediatamente após serem retiradas do nitrogênio líquido, eram expostas à temperatura ambiente por 5 segundos e, em seguida, submersas em água destilada à 20°C por 10 segundos. Após este processo, os embriões passavam por uma série de 5 soluções por 5 minutos em cada. As concentrações de sucrose em cada solução eram cada vez mais reduzidas para remoção dos crioprotetores. Após toda a remoção destes crioprotetores, os blastocistos eram lavados e cultivados em meio de cultivo Global (Global® - LifeGlobal) suplementado com HSA, à 37°C e 5,5% de CO₂, por um intervalo de 1 a 4 horas, antes de serem transferidos. No ciclo de transferência do(s) blastocisto(s) descongelado(s), as pacientes recebiam 6mg de estradiol (Estrofem®, Novo Nordisk) por dia, a partir do primeiro dia da menstruação para o preparo endometrial. Em torno do 10º ao 14º dia de uso de medicamento era realizado uma ultrassonografia endovaginal para avaliação da espessura endometrial. Quando visualizado um endométrio com espessura ≥ 8mm, era iniciado a progesterona micronizada 900mg/dia, via vaginal. A transferência do embrião era programada então para 5 dias após o início da progesterona.

Para a análise estatística foi utilizado o teste de Mann-Whitney para avaliação de variáveis quantitativas. Para verificar a associação de frequências foi utilizado o teste de Qui-Quadrado e o Teste Exato de Fisher, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Foram avaliados, retrospectivamente, 292 ciclos de congelamento e descongelamento de blastocisto, sendo que a idade média das mulheres foi de 34,35 anos. O número médio de blastocisto vitrificados/desvitrificados por paciente foi de 2,08 ± 0,87 (variando de 1 a 7 blastocis-

Tabela 1. Comparação entre os resultados do descongelamento do dia 5 versus dia 6

	Dia 5	Dia 6	P-valor
Idade (em anos) (média ± DP)	34,08±5,48	34,71±5,12	0,16
Número de blastocistos congelados (média ± DP)	2,14±0,96	1,98±0,73	0,36
Número de blastocistos descongelados (média ± DP)	1,69±0,81	1,67±0,84	0,89
Número de blastocistos transferidos (média ± DP)	1,63±0,75	1,62±0,79	0,96
Taxa de sobrevivência	77%	83%	0,30
Taxa de gravidez	54,11%	49,04%	0,50
Taxa de gestação múltipla	26,32%	12,5%	0,13

tos), totalizando 604 blastocistos descongelados. Desses embriões descongelados, 482 blastocistos sobreviveram (média de $1,68 \pm 0,82$). A taxa de sobrevivência do blastocisto ao congelamento e descongelamento foi de 80%. Dos 292 ciclos de descongelamento, não houve transferência embrionária em 23 casos, devido ao fato de não haver embriões disponíveis. Nos 269 ciclos em que houve transferência, uma média de $1,63 \pm 0,77$ blastocistos foram transferidos por paciente.

Das 292 pacientes, 57,53% tiveram os blastocistos congelados no dia 5 e 42,47% tiveram o congelamento no dia 6. A taxa global de gravidez por ciclo de descongelamento foi de 44,5% (130 gestações em 292 ciclos de descongelamento). A taxa de gravidez clínica por transferência foi 48% (130 gestações em 269 ciclos de descongelamento com transferência). A taxa de implantação foi de 30,5%. Das 130 gestações: 79% (103) gestação única, 20,2% (26) gestação gemelar e 0,8% gestação tripla (1).

Quando realizada a comparação dos resultados segundo o dia de congelamento (dia 5 x dia 6), não foi encontrada diferença significativa em relação à taxa de gravidez (Tabela 1).

DISCUSSÃO

A fertilização *in vitro* é uma das técnicas mais bem sucedidas e tem sido amplamente utilizada no tratamento da infertilidade. Entretanto, com o uso das gonadotrofinas na hiperestimulação ovariana, um maior número de óvulos é obtido e consequentemente, há uma maior disponibilidade de embriões viáveis para a transferência. Com o avanço do cultivo celular, houve uma melhora nas taxas de implantação o que acabou gerando um aumento nas taxas de gravidez múltipla. Assim, a gemelaridade, associada ao aumento do risco tanto para os fetos quanto para a mãe, é uma das complicações das técnicas de reprodução assistida que deve ser evitada. A fim de se reduzir o número de embriões transferidos sem, contudo diminuir a taxa de gravidez tem-se optado por prolongar o tempo de cultivo embrionário até o estágio blastocisto, conseguindo dessa forma, uma melhor seleção embrionária. Assim consegue-se diminuir o número de embriões transferidos, permitindo até a transferência de um embrião único, mantendo-se boas taxas de gravidez, além de permitir uma redução na taxa de gestação múltipla. A partir daí, o congelamento de blastocistos passou então a ser uma necessidade. Além do mais, quando se congela embriões apenas no estágio de blastocisto, o número de embriões excedentes se reduz, permitindo um aumento na capacidade de armazenamento do laboratório e uma melhor seleção dos embriões a serem guardados e transferidos futuramente.

As técnicas de criopreservação de blastocistos têm evoluído e a vitrificação tem mostrado melhores resultados. A vitrificação consiste em expor o embrião em pequenos volumes de soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguido de um rápido congelamento em nitrogênio líquido, o que permite uma desidratação rápida das células, fazendo com que elas entrem em um estado solidificado, evitando assim, a formação de cristais de gelo intracelular. Os estudos clínicos mostram excelentes taxas de sobrevivência dos embriões e de gestação ((Kuwayama et al., 2005, Youssry et al., 2008). A taxa de sobrevivência dos blastocistos vitrificados neste estudo foi de 80% comprovando a alta eficiência da técnica S³ Vitrification. Em um estudo do nosso grupo publicado em 2009 (Moraes et al., 2009) foi demonstrado uma taxa de sobrevivência menor (58%) do que no estudo atual, demonstrando uma melhora da técnica com a curva de aprendizado. No entanto, a taxa de sobrevivência de

80% está um pouco inferior a taxas apresentadas por outros autores (Kuwayama et al., 2005, Bernal et al., 2008, Loutradi et al., 2008).

A taxa global de gravidez por ciclo de descongelamento foi de 44,5% e a de gravidez clínica por transferência foi 48%, semelhante ao descrito por alguns autores (Liebermann et al., 2006, Mukaida et al., 2008). No entanto, essa taxa de gravidez é superior ao descrito por Liebermann et al., (taxa de gravidez de 42,9%) (Liebermann, 2009), Cho et al., (34%) (Cho et al., 2002) e Mukaida et al., (37%) (Mukaida et al., 2003) e inferior ao descrito por Osada et al., (56%) (Osada et al., 2003), Stehlik et al., (50%) (Stehlik et al., 2005) e Kuwayama et al., (53%) (Kuwayama et al., 2005).

A blastulação dos embriões humanos ocorre usualmente no dia 5 após a fertilização, mas pode atrasar até o dia 6. Vários estudos demonstraram que a transferência a fresco no dia 5 resulta em maiores taxas de gravidez do que a transferência a fresco de blastocisto no dia 6 (Osada et al., 2003, Shapiro et al., 2001, Barrenetxea et al., 2005). Entretanto, em avaliação do nosso grupo publicada em 2009 (Moraes et al., 2009), a transferência de blastocistos vitrificados/desvitrificados no dia 6 resultou em taxas de gravidez semelhantes às do dia 5, estando de acordo com o encontrado no presente estudo. Isto provavelmente se deve à melhor sincronia endométrio-embrião que é obtida com o preparo endometrial nos ciclos de transferência de blastocistos criopreservados (Kader et al., 2009). No estudo de Stehlik et al., 2005 (Stehlik et al., 2005) as taxas de gravidez foram maiores na transferência dos blastocistos vitrificados no dia 5 do que no dia 6, entretanto sem diferença estatística (50% dia 5 x 33% dia 6), assim como no estudo de Liebermann e Tucker, 2006 (48,7% de gravidez dia 5 x 42,8% dia 6). O mesmo ocorreu em nosso estudo, onde a taxa de gravidez foi maior dia 5 que dia 6 (54,1% x 49,04%), mas sem diferença estatística, confirmando os dados da literatura.

Estes resultados mostram que a vitrificação é uma excelente técnica e que os blastocistos têm uma alta taxa de sobrevivência e implantação após o descongelamento e transferência, podendo substituir o congelamento lento como já sugerem outros estudos (Stehlik et al., 2005). Existem várias técnicas de vitrificação. A S³ Vitrification, técnica utilizado neste estudo, é uma técnica rápida, de fácil execução, além de não utilizar o DMSO como crioprotetor. Nossos resultados de gravidez são satisfatórios e promissores. Portanto, pode-se concluir que o método de vitrificação de blastocistos é uma técnica eficiente, com altas taxas de sobrevivência, possibilitando o armazenamento dos embriões excedentes com boas taxas de gravidez em ciclos de descongelamento.

Endereço para Correspondência:

Rua Alvarenga Peixoto, 1329 Santo Agostinho BH - MG
Tel: (31) 3292 - 5299 FAX: (31) 3292 5299
e-mail: anamarcia.cota@procriar.com.br

Referências bibliográficas

- Barrenetxea G, Larruzzea AL, Ganzabal T, Jiménez R, Carbonero K and Mandiola M. Blastocyst culture after repeated failure of cleavage stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertil Steril*. 2005; 83:49-53.
- Bernal DP, Chang CC, Colturato LF, et al. Evaluation of blastocyst recuperation, implantation and pregnancy rates after vitrification/warming or slow freezing/thawing cycles. *Fertil Steril*. 2008; 90:S277-S278.
- Cho HJ, Son WY, Yoon SH, Lee SW, Lim JH: An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Hum Reprod*. 2002, 17:2419-2422.
- Choi DH, Chung HM, Lim JM, et al. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified human blastocysts.

- Fertil and Steril. 2000;74:838-839.
- Dare MR, Crowther CA, Dodd JM, Norman RJ. Single or multiple embryo transfer following in vitro fertilization for improved neonatal outcome: a systematic review of the literature. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2004;44(4):283-291.
- Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online.* 2004;9:680-691.
- Gardner DK, Lane M, Stevens JMT, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil and Steril.* 2000;73(6):1155-1158.
- Huang CC, Lee TH, Chen SU et al. Successful pregnancy following blastocyst cryopreservation using super-cooling ultra-rapid vitrification. *Hum Reprod.* 2005;20:122-128.
- Kader AA, Choi A, Orief Y and Agarwal A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009;7:99.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O: Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online.* 2005, 11:608-614.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2005;11:300-8.
- Liebermann J, Tucker MJ. Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil and Steril.* 2006;86(1):20-26.
- Liebermann J. Vitrification of human blastocysts: An update. *Reprod Biomed Online* 2009, 19(Suppl 2).
- Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and metaanalysis. *Fertil Steril.* 2008; 90:186-193.
- Michelmann HW, Nayudu P. Cryopreservation of human embryos. *Cell Tissue Bank* 2006; 7:135-141.
- Moraes LAM, Aguiar LPT, Lamaita RM, Marinho RM, Caetano JPJ. Comparação de resultados obtidos com uma nova técnica de vitrificação de blastocistos e com o congelamento lento de embriões no segundo e terceiro dias de cultivo. *JBRA.* 2009;13:16-10.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, et al. Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil and Steril.* 2001;76:618-620.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, et al. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod.* 2004;18:384-391.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod.* 2003, 18:384-391.
- Mukaida T, Takahashi K, Goto T, Oka C. Perinatal outcome of vitrified human blastocysts in 7 year experience (2670 attempted cycles). *Hum Reprod.* 2008, 23:48.
- Osada H, Aono F, Kuwayama M, Morita H, Teramoto S, Kato O. Clinical efficiency of vitrification on blastocysts transfer cycles. *Fertil Steril.* 2003, 80:S63-S63.
- Rijnders PM, Jansen CAM. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13:2869-2873.
- Shapiro BS, Richter KS, Harris DC and Daneshmand ST. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertil Steril.* 2001; 75:1126-1130.
- Son WY, Yoon SH, Yoon HJ et al. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod.* 2003;18:137-139.
- Stachecki JJ, Garrisi J, Sabino S, Caetano JP, et al. A new safe, simple, and successful Vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reprod Biomed Online.* 2008;17.
- Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer K, Kato O. Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online.* 2005;11(1):53-57.
- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983;305:707-709.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, et al. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoele cavity before vitrification. *Hum Reprod.* 2002;17:744-751.
- Vatja G. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online.* 2006;12(6):779-796.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and - 269°. *Science.* 1972;178:411.
- Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent, and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.* 1972;11:1071.
- Yeoman RP, Gerami-Naini B, Mitalipov S, Nusser KD, Widmann-Browning A A, Wolf DP. Cryoloop vitrification yields superior survival of rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod.* 2001;16:1965-1969.
- Yokota Y, Sato S, Yokota M, et al. Birth of a healthy baby following vitrification of human blastocysts. *Fertil and Steril.* 2001;75:1027-1029.
- Yousry M, Ozmen B, Zohni K, Diedrich K, Al-Hasani S. Current aspects of blastocyst cryopreservation. *Reprod Biomed Online.* 2008; 16:311-320.
- Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkman CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984;42:293-296.