

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

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS EM
PALHETA CONVENCIONAL DOTADA DE HASTE METÁLICA

ALEXANDRE AIQUEL VAZ COSTA

Porto Alegre

2007

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

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS EM
PALHETA CONVENCIONAL DOTADA DE HASTE METÁLICA

Autor: Alexandre Aiquel Vaz Costa

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

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

PORTO ALEGRE

2007

C837v Costa, Alexandre Aiquel Vaz

Vitrificação de embriões *Mus domesticus domesticus* envasados em palheta convencional dotada de haste metálica / Alexandre Aiquel Vaz Costa. - Porto Alegre: UFRGS, 2007.

xxf.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2007. José Luiz Rodrigues, Orient.

1. Reprodução animal 2. Vitrificação 3. *Mus domesticus domesticus* 4. Palheta IMV I. Rodrigues, José Luiz , Orient. II. Título

CDD 619.38

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS

Faculdade de Veterinária
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias

APROVADO POR

Prof. Dr. Rui Fernando Félix Lopes
Membro da Banca

Prof. Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira
Membro da Banca

Prof. Dr. João Carlos Dechamps
Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

Grandes diretrizes na vida são constituídas de escolhas possíveis de concretizarem-se e da soma de múltiplos pequenos esforços que carecem do apoio alheio. Não há progressão possível sem que os mais capazes transfiram espontaneamente aos seus aprendizes o conhecimento, e isso envolve não somente fazer-se compreender, mas também e, principalmente, estender a mão na forma de aprovação explícita e implícita aos tropeços que o iniciante venha a ter, e acreditar que o anacrônico, o é temporariamente, e ver que ali a sincronia do saber e realizar está presente e palpante, restando esperar sua manifestação . Por isso, sou grato a compreensão, ao apoio e ao incentivo diário que recebi do Professor orientador Dr. José Luiz Rodrigues, sem o que eu não conseguiria a progressão que efetivei. Aos colegas, Natália Schmidt e Eduardo Allix, devo grande parte do que consegui através da sua ajuda indispensável na fase dos experimentos. Ao colega Steigleder devo a orientação na organização de vários passos inerentes ao mestrado.

Não vou relacionar todos os que estiveram presentes na minha progressão para privar-me de cometer injustiças se esquecesse do ocorrido ao longo desses últimos 24 meses.

A meu pai, que foi Professor nesta Universidade dedico póstumamente tudo o que pode ser colhido de bom em mim pelos outros, foi ele quem me ensinou ciência quando eu ainda usava fraldas, e não tenho palavras para descrever sua imensa personalidade, riquíssima ao ponto de passar despercebido quando sem ele eu não teria conseguido nada.

RESUMO

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS EM PALHETA CONVENCIONAL DOTADA DE HASTE METÁLICA

Dissertação de Mestrado

Autor: Alexandre Aiquel Vaz Costa

Orientador: José Luiz Rodrigues

O objetivo deste experimento foi determinar a sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificado em palhetas na presença de uma haste metálica. Blastocistos *Mus domesticus domesticus* coletados no quarto dia após a fecundação, foram avaliados morfológicamente e divididos aleatoriamente em três grupos. Os embriões do grupo controle foram transferidos para gotas de meio KSOM e cultivados *in vitro* por 48 horas. Os embriões selecionados para criopreservação foram expostos a uma solução crioprotetora constituída por PBSm + de 10% etileno-glicol + 10% propileno-glicol, para promover uma desidratação das células embrionárias. Após foram transferidos para a solução de vitrificação que continha 20% etilenoglicol + 20% propilenoglicol diluídos em PBSm, e mantidos durante 25 segundos, sendo imediatamente imersos em nitrogênio submetido à vácuo. As taxas de sobrevivência embrionária revelaram uma maior eficiência da técnica com a inserção da peça metálica (56,21% - 86/153) em relação ao método convencional (18,84% - 26/138). Concluímos assim que a presença da peça metálica em contato com a amostra propiciou maior taxa de sobrevivência dos embriões submetidos à vitrificação envasados em palhetas de 0,25 mL.

Palavras-chave: camundongo; embrião; vitrificação; metal; palheta IMV.

ABSTRACT

***Mus domesticus domesticus* embryo vitrification using original straws containing a metallic stick**

Master's Dissertation

Author: Alexandre Aiquel Vaz Costa

Adviser: José Luiz Rodrigues

*The aim of this experiment was determine the *Mus domesticus domesticus* blastocysts survival rates after vitrification in straws containing a metallic stick, that allows to increase the temperature changes among the nitrogen and the embryo sample. Day 4 *Mus domesticus domesticus* blastocysts were collected from superovulated donors and after morphologically evaluation were randomly divided in three groups. The embryos select as control group were transferred to KSOM medium drops and in vitro cultured during 48 hours. The criopreservation selected embryos were first exposed to a cryoprotective solution (modified PBS + 10% ethylene-glycol and 10% propylene-glycol) to promote embryo cell dehydration and after exposed during 25 seconds to the vitrification solution composed by modified PBS + 20% ethylene-glycol and 20% propylene-glycol, and immediately plunged into slush liquid nitrogen. The embryo survival rate in group vitrified in the straws containing the metallic stick (56,21% - 86/153) was significantly different from the observed in the group loaded in original straws (18,84% - 26/138). In conclusion, the presence of the metallic stick in contact with the sample was efficient to enhance more suitable survival rates after vitrification of *Mus domesticus domesticus* blastocysts loaded in 0,25 mL straws.*

Keywords: mouse; embryo; vitrification; metal; palette IMV.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de eclosão dos embriões vitrificados em palhetas convencionais (0,25mL)	27
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitro(s)
μm	micrômetro(s)
BSA	albumina sérica bovina (<i>Bovine serum albumine</i>)
cm	centímetro(s)
CO ₂	dióxido de carbono
CE	calor específico
eCG	gonadotrofina coriônica equina
EG	etileno glicol
GLY	glicerol
hCG	gonadotrofina coriônica humana
hs	horas
IETS	International Embryo Transfer Society
IIF zone	Intracelular Ice Formation Zone
KSOM	meio de cultivo simplificado acrescido de K ⁺
M	molar
mg	miligramas
min	minuto
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
mOsm	miliosmol(s)
N ₂	nitrogênio líquido
°C	grau Celsius
OPS	palteras esticadas abertas (<i>Open pulled straw</i>)
PBSm	solução salina fosfatada tamponada modificada
pH	potencial de hidrogênio
PROH	propanediol
SAC	sacarose
SC	Solução crioprotetora
SD	Solução de desidratação
SV	Solução de vitrificação
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 ARTIGO	
VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES <i>Mus domesticus domesticus</i> ENVASADOS EM PALHETA CONVENCIONAL DOTADA DE HASTE METÁLICA.....	20
RESUMO	20
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAIS E MÉTODOS	24
Animais	24
Produção e coleta dos embriões	24
Haste metálica	25
Vitrificação.....	25
Análise estatística.....	26
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	29
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
.....	

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de embriões vem sendo um processo em contínuo desenvolvimento; iniciado por Whittingham *et al.* (1972), utilizando o *Mus domesticus domesticus* como modelo experimental. Os experimentos realizados deixaram claro o papel do equilíbrio osmótico entre o meio intracelular e o extracelular, durante o processo de congelamento, que Mazur (1990) designou como a curva de desidratação dos embriões em congelamento, que os desidrate o suficiente para manter o potencial químico da água intracelular perto daquele da água extracelular, presente em solução e em parte congelada. O potencial químico da água tem como variáveis, entre outras, o volume de água presente na solução, a concentração de solutos presente na solução e a temperatura da solução e, a solução intracelular que é considerada como o conjunto dos constituintes do citoplasma. O ponto de equilíbrio no congelamento do citoplasma dos mamíferos está em torno de $-0,6^{\circ}\text{C}$ (MAZUR, 1990). Mas, a solução citoplasmática, no entanto, permanece não congelada e sim resfriada, até temperaturas consideravelmente baixas, mesmo na presença de gelo fora da célula. A solução não pode permanecer super-resfriada na presença de cristais de gelo, porque estes são nucleadores de água – induzem a cristalização. A presença de cristais de gelo, durante o descenso da temperatura, opera como indutor da formação de mais cristais no fenômeno de nucleação, mesmo que os primeiros cristais sejam induzidos pela queda abrupta da temperatura. Células com citoplasma super-resfriado e gelo extracelular, só conseguem se manter assim, por terem a proteção da membrana plasmática.

A água super-resfriada da célula tem por definição (MAZUR, 1990) um potencial químico mais alto do que a solução extracelular e o gelo que estão em equilíbrio fora da célula. Se não saísse água do citoplasma, o potencial químico aumentaria com o decréscimo da temperatura. No entanto, em resposta a esta diferença de potencial, a água flui para fora da célula e congela externamente. Esta evasão de água intracelular para o meio extracelular, causa uma concentração dos solutos intracelulares e a redução do potencial químico da água intracelular, o que reduz o grau de super-resfriamento e equilibra os meios.

Para que este equilíbrio evolua a um estado estável, há a necessidade do estabelecimento de uma curva de congelamento, que reflete o decréscimo da temperatura em graus centígrados e o tempo em que isso é feito. Além disso, há outra providência necessária, que é a qualificação e quantificação do agente crioprotetor o

qual é adicionado ao meio onde está o conjunto de células e que deverá penetrá-las, caso estes sejam difusíveis pela membrana celular – o que caracteriza os crioprotetores permeáveis, ou se manter externamente, os não permeáveis. Assim, é que por exemplo, embriões em congelamento a 2°C/min em glicerol 1M chegarão a um equilíbrio em torno dos -33°C (LEIBO; McGRATH; CRAVALHO, 1978) e ,assim, a osmolaridade interna total iguala-se à osmolaridade externa num valor fixado de temperatura abaixo de zero (MAZUR, 1990).

A zona de formação de gelo (IIF zone)

E à razão do decréscimo de temperatura ocorre uma desidratação do citoplasma e uma conseqüente retração do volume celular. Se esta retração do volume celular causada pela desidratação prévia do citoplasma ocorrer antes de atingir-se uma temperatura de nucleação intracelular, permite o que Mazur (1990) chamou de resgate das células da zona de formação de gelo, a “IIF zone” (*intracelular ice formation zone*), isto é: que haja a possibilidade de recuperação dos embriões ainda não inutilizados e inviabilizados pela nucleação de cristais suficientes para causar lesão intracelular. Assim ,o embrião com volume reduzido que entrar na “IIF zone”, que caracteriza uma temperatura abaixo de -33°C, poderá ser salvo graças à ausência de nucleação de gelo intracelular, impossibilitada pela evasão da água intracelular.

Ao par de tudo isso, para a criopreservação de embriões, a inclusão do crioprotetor que permeia para dentro da célula ,é essencial (KASAI, 2002), e o mecanismo de proteção dos agentes permeantes é o mesmo, mas suas toxicidades são diferentes. Para um congelamento lento, a concentração do crioprotetor é limitado a 1-2 M e a toxicidade é relativamente baixa. No entanto, tratando-se de um estado onde não há um equilíbrio – a vitrificação – a concentração pode ser tão alta quanto 8 M. Além de agentes permeantes intracelulares, crioprotetores não permeantes, como sacarídeos e macromoléculas, são freqüentemente adicionados à solução (KASAI, 1996), no entanto, eles têm baixa toxicidade por se manterem no meio extracelular.

A permeabilidade pode ser analisada a partir da mudança de volume celular durante a suspensão na solução crioprotetora (JACKOWSKI; LEIBO; MAZUR, 1980). Nesta suspensão, embriões desidratam rapidamente, perdendo água em resposta à osmolaridade extracelular. Então, assim que o agente crioprotetor permeia a membrana celular indo ao citoplasma, a água reingressa na célula para manter o equilíbrio intracelular e o volume regenera-se.

Segundo Kasai (2002): “A capacidade de permeação do crioprotetor difere não só pelo agente crioprotetor, mas também na dependência do estágio de desenvolvimento embrionário e espécie considerada. Geralmente a permeação rápida é desejável porque: 1. a permeação é essencial para prevenir a formação de gelo intracelular; 2. a rápida permeação pode diminuir o tempo de exposição diminuindo o dano pela toxicidade ; e 3. a rápida difusão pode minimizar o aumento de volume (*swelling*) durante a remoção do crioprotetor no descongelamento. A permeação do crioprotetor é influenciada pelo temperatura – quanto mais alta a temperatura, mais rápido ocorre a permeação”.

O gelo não se forma durante o congelamento rápido – aqui o citoplasma supercongelado vitrifica – ou cristais de gelo formam-se, mas tão pequenos que não causam danos. No caso do citoplasma vitrificado, uma curva de descongelamento lenta é danosa pela desvitrificação com possibilidade de cristalização (RALL e POLGE, 1984). No caso do prévio congelamento rápido com os pequenos cristais, estes podem vir a aumentar de tamanho no descongelamento lento, pela transformação para fase sólida conhecida como recristalização e danificar as células. Mas quando a curva de descongelamento é rápida não há tempo suficiente para desvitrificação ou recristalização e há maior sobrevivência (RALL e FAHY, 1985).

Se há o estado de equilíbrio, a quantidade de água é pequena o bastante e a quantidade de soluto intracelular é grande o bastante para que a água intracelular vitrifique ou forme inócuos cristais de gelo durante o subsequente congelamento rápido até abaixo de -70°C . O destino dos embriões, conseqüentemente, depende se o descongelamento é rápido o suficiente para impedir a desvitrificação ou recristalização. Estas inferências foram observadas por Rall, Reid e Polge (1984) em embriões de 8 células congelados lentamente ($0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) a -31°C e rapidamente levados a -147°C , seguidos de descongelamento lento. Isso forma a base do conhecimento para o que Mazur (1990) chama de fronteira para resgate da IIF, que exprime a etapa em que os embriões podem ser recuperados dos efeitos adversos do congelamento rápido através do rápido descongelamento; e é a etapa em que a água intracelular ou vitrifica ou forma inócuos pequenos cristais de gelo durante o congelamento rápido abaixo de -70°C . A fronteira superior de água contida intracelular corresponde àquela do equilíbrio a -20°C onde abaixo disso os embriões precisam ser congelados perto das taxas de equilíbrio para poderem ser subsequentemente rapidamente congelados. Se um embrião inicialmente suspenso em 1,5M de glicerol ou DMSO ainda permanece contendo mais

que 16% da água que contém em condições isotônicas, quando ele entra na “IIF zone” esta água restante vai congelar intracelularmente e matar o embrião. Mas se ele entra na “IIF zone” com menos do que 16% de água que tinha isotonicamente ou menos que 6 a 9% respectivamente, em DMSO e glicerol, esta água vai congelar durante o subsequente rápido congelamento, mas são cristais inócuos que restarão e assim permanecerão se houver rápido descongelamento. Se o embrião entrar na “IIF zone” com <6-9% de água remanescente e >3-5%, o equilíbrio do conteúdo de água dar-se-á, respectivamente, a -60°C e -45°C e esta água vai vitrificar ou formar cristais inócuos de gelo ao ser congelada rapidamente. Note-se, portanto, que pouca água é requerida para que os embriões sejam resgatáveis da “IIF zone”, assim como altas osmolaridades dos solutos intracelulares (MAZUR, 1990).

Os métodos de criopreservação

Kasai (2002) postulou que, de maneira ampla, os métodos de criopreservação podem ser classificados como: congelamento ou vitrificação. O congelamento lento requer um procedimento controlado de redução da temperatura antes de a amostra ser mergulhada no nitrogênio líquido. A vitrificação, em contraste, permite que se coloque a amostra em nitrogênio líquido a partir de temperaturas acima de 0°C usando soluções altamente concentradas, para que células sejam criopreservadas, elas devem ser mantidas em temperatura abaixo da temperatura de transição vítrea, que é aproximadamente -130°C e na prática o nitrogênio líquido (-196°C) é usado para manter esta condição básica. E, não só durante o congelamento, mas também no descongelamento as células correm o risco de serem danificadas.

Para evitar que haja cristalização durante o congelamento ou recristalização no descongelamento, é desejável que haja suficiente concentração do meio intracelular gerando condições para que haja vitrificação quando as células forem ultrapassar a temperatura de transição vítrea. De acordo KASAI (2002), para que ocorra a vitrificação intracelular de embriões mamíferos, a inclusão de crioprotetores é essencial. Quando os embriões são recuperados no descongelamento, ocasionalmente eles apresentam rompimentos na zona pelúcida, denominados de fraturas (RALL e MEYER, 1989). Este dano físico pode ser devido a uma não uniforme transição da fase líquida para a fase sólida durante a rápida mudança de fases. A fratura pode ser reduzida, reduzindo-se a velocidade de congelamento e de descongelamento quando a temperatura atravessa os -130°C , o ponto de transição vítrea (RALL e MEYER, 1989). A fratura relaciona-se

também com o recipiente onde são guardados os embriões – quanto mais flexíveis, menos fraturas (LANDA, 1982). Em vitrificação usando palhetas, fratura pode ser prevenida congelando e descongelando até -130°C (KASAI, 1996).

Ao descongelarem-se células, o crioprotetor tem que ser removido – se as células são colocadas diretamente em solução isotônica, elas correm o risco de sofrer um inchaço: uma superexpansão porque a água entra no citoplasma mais rápido do que o crioprotetor sai. A estratégia para vencer este problema é usar uma solução hipertônica com solutos não-permeantes para conter o excesso de influxo de água (LEIBO, 1983) e a inclusão de sacarose na solução de criopreservação pode ajudar a prevenir a superexpansão. Como um pequeno sacarídeo a sacarose pode promover a retração antes da diluição (KASAI, *et al.* 1990).

Mas ao ajudar a remover o crioprotetor das células, através da sua difusão para fora do meio intracitoplasmático, a sacarose pode desidratar os embriões excessivamente, reduzindo-lhes o volume. Assim como no estresse hipotônico onde havia inchaço, também aqui no estresse hipertônico há desidratação e chance de danos (PEDRO *et al.* 1997). Portanto, após a difusão do crioprotetor para fora do meio intracelular - para a solução hipertônica extracelular - os embriões têm que ser transferidos para soluções menos concentradas e depois para uma solução isotônica.

Em 1985, Rall e Fahy descreveram um método novo de criopreservação chamado de vitrificação, no qual embriões suspensos em uma solução altamente concentrada com crioprotetores eram colocados numa palheta e diretamente expostos ao nitrogênio líquido, a partir de uma temperatura acima de 0°C . Eliminava-se assim a possibilidade de formação de gelo e os procedimentos comuns ao lento congelamento, com a vantagem adicional de altas taxas de viabilidade dos embriões. Mas se a concentração de crioprotetor na solução não for suficiente, pode haver formação de gelo intracelular. O grande obstáculo desse processo é a toxicidade da solução crioprotetora por causa dos 5-8 M requeridos. Muitas mudanças desde então foram feitas e já se consegue vitrificar embriões com soluções crioprotetoras menos tóxicas (VAJTA *et al.* 1997).

Otimização da vitrificação

Kasai (2002) conceitua uma nova estratégia para acelerar a velocidade de resfriamento e aquecimento do sistema contendo os embriões e, ao mesmo tempo, reduzir a concentração das soluções crioprotetoras, utilizando pequenos volumes, a qual denominou vitrificação ultra-rápida. O acondicionamento para a vitrificação

convencional era uma palheta plástica usada em inseminação artificial (0,25 mL). Como esta é relativamente pequena (2,0 mm de diâmetro externo e 13 cm de comprimento) quando ela era colocada diretamente no nitrogênio líquido e depois reaquecida em água, a escala de congelamento e de descongelamento variava 2.500°C/min entre -25e -175°C (RALL e FAHY, 1985; VAJTA,*et al.* 1998). Contudo, as células continuaram a sofrer os problemas do congelamento (sofrimentos como inclusões lipídicas citoplasmáticas, gelo intracelular, etc.), segundo Martino, Songsasen e Leibo (1996).

Um método efetivo de conseguir uma velocidade maior de congelamento foi minimizar o volume da solução e da embalagem de acondicionamento e a partir daí técnicas foram desenvolvida para reduzir o volume da amostra que contém os embriões.

Martino, Songsasen e Leibo (1996) anunciaram o congelamento de oócitos bovinos num fino filme (<1 µL) de solução de vitrificação colocado num dispositivo usado para microscopia eletrônica (grades de microscopia eletrônica). Por ser esta grade pequena 3,05 mm de diâmetro e 0,037 mm de altura, era possível o congelamento quase instantâneo da amostra colocada em contato com o nitrogênio líquido. Esta grade era guardada em nitrogênio líquido usando um dispositivo: “cryovial cap and globet” (PARK *et al.*, 2001).

Entretanto, as grades de microscopia eletrônica eram muito pequenas e muito poucos oócitos e embriões podiam ser aí colocados. Com uma modificação, Matsumoto *et al.* (2001) sugeriram o uso de uma peça de nylon triangular em malha,(com 1,0 cm de base; 1,3 cm de altura com malha de 60 micra); que permitia armazenar 65 oócitos de bovinos com *cumulus*. Vajta *et al.*(1997) desenvolveram um sistema capilar alternativo chamado de “open-pulled straw” (OPS); ele aquecia palhetas de inseminação de 0,25 mL e puxava-as manualmente até que seu diâmetro interno e parede na porção central decrescesse de 1,7 para 0,8 mm e de 0,15 para, aproximadamente, 0,07 mm, respectivamente. Então as palhetas eram cortadas na parte mais estreita com uma lâmina. Os embriões eram armazenados por efeito de sucção capilar, e aspirada a solução em uma coluna de 2-3 mm (1,0 a 1,5 µL). Embora difícil de medir precisamente as curvas de resfriamento e aquecimento, Kasai (2002) estima que a coluna líquida do OPS congele a 22.500°C (entre -25°C e -175°C), enquanto que a palheta original congela a 2.500°C/min (VAJTA,*et al.* 1998). Como uma modificação à OPS, Tominaga e Hamada (2001) aproveitaram ponteiros plásticos de micropipetas como capilares, que eram processados cortando 10-15 mm da ponteira e os embriões eram armazenados aí

com a ajuda de uma micropipeta. O diâmetro interno era aproximadamente 200 μm e o volume da solução de vitrificação de 0,6-07 μL . Nos dois sistemas, de ponteiras e OPS, os capilares eram submersos verticalmente em nitrogênio líquido.

Lane *et al.* (1999) desenvolveram um sistema chamado de “cryoloop” que consiste numa alça minúscula de nylon (20 μm de largura com 0,5 a 0,7 mm de diâmetro) montada numa base de aço inoxidável acoplada a uma tampa do tubo criogênico plástico. Os oócitos e embriões eram contidos na alça com um fino filme de solução de vitrificação que no total perfazia <1 μL . O tubo criogênico era submerso no nitrogênio líquido com o cryoloop e então era selado. Como a amostra estava contida no tubo criogênico ela podia ser guardada facilmente.

Outra técnica de vitrificação ultra-rápida foi denominado de microgotas por Landa e Tepla (1990). Originalmente este procedimento foi descrito, sem a intenção de aumentar a velocidade da curva de resfriamento e aquecimento. Papis, Shimizu e Izaike (1999) descreveram este procedimento como mais efetivo do que o que usa tradicionalmente palhetas para vitrificação de embriões bovinos em estágios iniciais de clivagem. Com este método oócitos e embriões suspensos numa solução de vitrificação eram aspirados numa pipeta e expelidos numa superfície de nitrogênio líquido como uma microgota. Então, a microgota de 4-8 μL vitrificava sem a presença de uma etapa intermediária. Le Gal e Massip (1999) adotaram e modificaram o método das microgotas, pingando-as não em nitrogênio diretamente mas numa superfície metálica com parte imersa em nitrogênio líquido. Dinnyes *et al.* (2000) denominaram este procedimento de vitrificação em superfície sólida.

O volume em questão

Seria possível acelerar a velocidade de resfriamento da amostra na presença de volumes considerados não adequados? Se possível, qual a repercussão disso nos procedimentos de criopreservação ?

Este experimento comprova que se pode utilizar estratégias alternativas, com manutenção de volumes convencionais e baixas concentrações de crioprotetores da amostra, preservando-se eficientes taxas de sobrevivência embrionária na vitrificação ultra-rápida.

O perseguir do aumento da taxa de transferência de calor ao longo as últimas décadas tem sido evidente ao proporem-se técnicas que minimizam os volumes das amostras no

intento de que, em havendo menor quantidade de solução nas amostras, pudesse haver um decréscimo mais rápido da temperatura. Desde que Rall e Fahy (1985) conseguiram a primeira vitrificação com sucesso de embriões de camundongo, sucede-se a busca de Landa e Tepla (1990) por menor volume utilizando a técnica de “microgotas”, Martino, Songsasen e Leibo (1990) empregando as “grades de microscopia eletrônica” indo até Vatja *et al.* (1997), com o desenvolvimento das palhetas estiradas que continham menos volume, as “OPS” e expunham a amostra que continham diretamente ao nitrogênio líquido. Este percurso à busca de aumento da velocidade de resfriamento do sistema faz-se entender, por ser este aumento de velocidade uma das variáveis possível, de ser manipulada no caso de se pretender diminuir o tempo de exposição de uma amostra a uma alta concentração de crioprotetor e, assim, diminuindo a toxicidade resultante dessa exposição. A luta pela otimização da transferência de calor tem no nitrogênio submetido ao vácuo, outra frente de trabalho, onde o ponto de ebulição reduzido pela ação de pressão negativa (vácuo), resulta em temperatura inferior a -200°C e aumento da captação do calor da amostra pelo nitrogênio circundante, durante a imersão da amostra e seu continente envasante sem que haja a excessiva formação de bolhas de gás no seu entorno (MARTINO, SONGSASEN e LEIBO, 1996). O esforço compreendido nas tentativas de conseguir mais rápida transferência de calor e menor resfriamento da amostra, tem a intenção de diminuir a excitação química dos constituintes da solução final do citoplasma e facilitar-lhe o alcance ao estado de maior viscosidade e assim operar a prevenção do fenômeno da cristalização e acelerar a vitrificação. Ora, se o volume é importante, assim como a taxa de transferência de temperatura, nada é mais adequado, do que o proposto no atual experimento: a inserção de uma haste metálica dentro da palheta convencional reduzindo-lhe o volume total da amostra e fixando uma ponte metálica entre a amostra e o nitrogênio circundante; ponte esta com calor específico muito baixo e com alta capacidade condutiva de temperatura, resultando no que ficou patente na análise dos resultados, ou seja: um ganho de sobrevivência superior e estatisticamente significativa.

Vitrificação ultra-rápida

Kasai (2002) discute uma outra estratégia, proposta por Martino, Songsasen e Leibo (1996), para aumentar a velocidade da curva de congelamento, que é utilizar nitrogênio líquido parcialmente solidificado – o nitrogênio “slush” ao invés do nitrogênio líquido. Nitrogênio slush obtido submeter-se o nitrogênio líquido a uma pressão negativa (vácuo). De acordo com Nowshari e Brem (2001) com a redução da

pressão, a temperatura do nitrogênio decresce abaixo do ponto de ebulição, para aproximadamente -200°C , o que previne o borbulhar em volta da amostra quando imersa, aumentando desta forma a velocidade da troca de temperaturas. Usando o nitrogênio slush ao invés do nitrogênio líquido, estima-se que a curva de resfriamento aumente de 3.000 para $24.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (entre 0 e -60°C), segundo Martino, Songsasen e Leibo (1996).

Essencialmente, a solução crioprotetora usada na vitrificação ultra-rápida, é a mesma utilizada na vitrificação convencional. Como crioprotetor permeante o etilenoglicol tem sido usado na vitrificação ultra-rápida, exceto nos primeiros estudos de Landa e Tepla (1990), que utilizavam glicerol para crioconservar embriões de 8 células de rato. Etilenoglicol é usado tanto sozinho como em associação com o DMSO (VAJTA *et al.*, 1997). Usualmente um sacarídeo (0,3 a 1,0 M de sacarose) é adicionado à solução crioprotetora, como agente não permeante, gerando o efeito osmótico desejado, isto é, impedindo a troca rápida de líquidos através da membrana plasmática, reduzindo a superexpansão das células embrionárias (LE GAL e MASSIP, 1999; VAJTA *et al.*, 1999). Além disso, macromoléculas têm sido usadas em alguns casos; como por exemplo, soluções contendo Ficoll (KASAI, 1990), que é um eficiente componente de vitrificação em soluções, é usado para vitrificação. Estas soluções crioprotetoras são empregadas em cryoloops, OPS e grids de ME (PARK *et al.*, 1999; VAJTA *et al.*, 1999; MUKAIDA *et al.*, 2001).

Uma vantagem da vitrificação ultra-rápida é que a formação de gelo intracelular pode ser prevenida com uma pequena quantidade de crioprotetor, suficiente para indução do estado vítreo, reduzindo a toxicidade nas células embrionárias. A concentração de crioprotetores usada na vitrificação ultra-rápida é mais baixa do que a utilizada na vitrificação convencional, nesta 40% ou mais de crioprotetor é empregada e na ultra-rápida são utilizados 30% da solução crioprotetora (MARTINO, SONGSASEN e LEIBO, 1996; MUKAIDA *et al.*, 2001).

Nos métodos de vitrificação ultra-rápida, embriões são expostos a soluções contendo menores concentrações de crioprotetor, antes de serem suspensos na solução de vitrificação (WALKER, CAMPOS-CHILLON e SEIDEL, 2006). O pré-tratamento é efetivo para promover a permeação do crioprotetor em condições de menor toxicidade. A concentração de crioprotetor usado no pré-tratamento varia de 2-3% a 20%. Em alguns casos, entretanto, os embriões são expostos direto à solução de vitrificação.

O tempo de exposição à solução de vitrificação é o mínimo necessário para impedir que haja formação de gelo intracitoplasmático porque a solução de vitrificação é tóxica. O tempo ótimo não depende somente da solução de vitrificação, mas também do tipo de célula, e estas duas variáveis dependem igualmente da temperatura. Em muitos casos (MARTINO, SONGSASEN e LEIBO, 1996; VAJTA *et al.*, 1998) os embriões foram expostos por 25 a 30 segundos temperaturas ao redor de 35°C.

Embriões sensíveis à criopreservação por outros fatores além do congelamento também foram criopreservados com sucesso. Embriões de hamsters são sensíveis ao meio *in vitro*, mas tiveram nascimentos a partir do uso do método cryoloop (LANE, *et al.*, 1999). Em humanos, bebês nasceram de oócitos vitrificados usando OPS ou grips de ME. Lane, Schoolcraft e Gardner (1999) mostraram que blastocistos humanos criopreservados em cryoloops eram capazes de desenvolverem-se em cultura. Mukaida *et al.* (2001) mostraram que blastocistos vitrificados eram capazes de tornarem-se bebês normais.

Em vitrificação ultra-rápida as velocidades de resfriamento e de descongelamento são críticas. É tido como verdade que quanto mais rápidos o congelamento e o descongelamento, maior taxa de sobrevivência, porque a formação de gelo intracelular é eficazmente prevenida. Apesar disso, Hochi *et al.* (2001) chegaram à conclusão que a velocidade de 3.000°C/min é melhor do que 5.000 ou 12.000°C/min (para ir de -25 até -175°C), isso é um pouco mais do que a velocidade da vitrificação em palhetas convencionais.

Uma desvantagem dos métodos descritos para a vitrificação ultra-rápida é o contato direto da solução crioprotetora, que contém os embriões, com o nitrogênio líquido, o que pode ser uma fonte de contaminação por patógenos. Vajta *et al.* (1998) contornaram este problema usando nitrogênio líquido filtrado para o método OPS. Os métodos ultra-rápidos estão indicados para embriões sensíveis ao congelamento convencional e para aqueles com baixa permeabilidade.

O delineamento experimental presente privilegia o teste do aumento da viabilidade de sobrevivência embrionária a partir da introdução de uma haste metálica que faz a união entre a amostra a vitrificar e o nitrogênio submetido à vácuo externo utilizando nos experimentos palhetas convencionais no intento de manter o volume original destas e apropriar às palhetas uma capacidade de resfriamento adicional. Tendo sido escolhido o material metálico conforme o seu calor específico, levando em conta a

relação inversamente proporcional entre calor específico e taxa de transferência de temperaturas. Para tanto o Ouro que possui baixo calor específico ($CE=0,032$) e tem baixo poder oxidante e alta maleabilidade foi o metal eleito para os experimentos.

2 ARTIGO

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS EM PALHETA CONVENCIONAL DOTADA DE HASTE METÁLICA

Alexandre Aiquel Vaz Costa¹, José Luiz Rodrigues²

RESUMO

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS EM PALHETA CONVENCIONAL DOTADA DE HASTE METÁLICA

Dissertação de Mestrado

Autor: Alexandre Aiquel Vaz Costa

Orientador: José Luiz Rodrigues

O objetivo deste experimento foi determinar a sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em palhetas na presença de uma haste metálica. Blastocistos *Mus domesticus domesticus* coletados no quarto dia após a fecundação, foram avaliados morfológicamente e divididos aleatoriamente em três grupos. Os embriões do grupo controle foram transferidos para gotas de meio KSOM e cultivados *in vitro* por 48 horas. Os embriões selecionados foram expostos a uma solução crioprotetora constituída por PBSm + de 10% etileno-glicol + 10% propileno-glicol, para promover uma desidratação das células embrionárias. Após foram transferidos para a solução de vitrificação que continha 20% etilenoglicol + 20% propilenoglicol diluídos em PBSm, e mantidos durante 25 segundos, sendo imediatamente imersos em nitrogênio submetido à vácuo. As taxas de sobrevivência embrionária revelaram uma maior eficiência da técnica com a inserção da peça metálica (56,21% - 86/153) em relação ao método convencional (18,84% - 26/138). Concluímos assim que a presença

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias-UFGRS.

² PhD Professor Titular Departamento de Patologia Veterinária – FAVET-UFRGS.

da haste metálica em contato com a amostra propiciou maior taxa de sobrevivência dos embriões submetidos à vitrificação envasados em palhetas de 0,25 mL.

Palavras-chave: camundongo; embrião; vitrificação; metal; palheta IMV.

ABSTRACT

*The aim of this experiment was determine the *Mus domesticus domesticus* blastocysts survival rates after vitrification in straws containing a metallic stick, that allows to increase the temperature changes among the nitrogen and the embryo sample. Day 4 *Mus domesticus domesticus* blastocysts were collected from superovulated donors and after morphologically evaluation were randomly divided in three groups. The embryos select as control group were transferred to KSOM medium drops and in vitro cultured during 48 hours. The selected embryos were first exposed to a cryoprotective solution (modified PBS + 10% ethylene-glycol and 10% propylene-glycol) to promote embryo cell dehydration and after exposed during 25 seconds to the vitrification solution composed by modified PBS + 20% ethylene-glycol and 20% propylene-glycol, and immediately plunged into slush liquid nitrogen. The embryo survival rate in group vitrified in the straws containing the matallic stick (56,21% - 86/153) was significantly different from the observed in the group loaded in original straws (18,84% - 26/138). In conclusion, the presence of the metallic stick in contact with the sample was efficient to enhance more suitable survival rates after vitrification of *Mus domesticus domesticus* blastocysts loaded in 0,25 mL straws.*

Keywords: mouse; embryo; vitrification; metal; palette IMV.

INTRODUÇÃO

Seria possível acelerar a velocidade de resfriamento da amostra na presença de volumes considerados não adequados? Se possível, qual a repercussão disso nos procedimentos de criopreservação ?

Este experimento comprova que se pode utilizar estratégias alternativas, com manutenção de volumes convencionais e baixas concentrações de crioprotetores da amostra, preservando-se eficientes taxas de sobrevivência embrionária na vitrificação ultra-rápida.

O volume em questão

O perseguir do aumento da taxa de transferência de calor ao longo as últimas décadas tem sido evidente ao proporem-se técnicas que minimizam os volumes das amostras no intento de que, em havendo menor quantidade de solução nas amostras, pudesse haver um decréscimo mais rápido da temperatura. Desde que Rall e Fahy (1985) conseguiram a primeira vitrificação com sucesso de embriões de camundongo, sucede-se a busca de Landa e Tepla (1990) por menor volume utilizando a técnica de “microgotas”, Martino, Songsasen e Leibo (1990) empregando as “grades de microscopia eletrônica” indo até Vatja *et al.* (1997), com o desenvolvimento das palhetas estiradas que continham menos volume, as “OPS” e expunham a amostra que continham diretamente ao nitrogênio líquido. Este percurso à busca de aumento da velocidade de resfriamento do sistema faz-se entender, por ser este aumento de velocidade uma das variáveis possível, de ser manipulada no caso de se pretender diminuir o tempo de exposição de uma amostra a uma alta concentração de crioprotetor e, assim, diminuindo a toxicidade resultante dessa exposição. A luta pela otimização da transferência de calor tem no nitrogênio submetido ao vácuo, outra frente de trabalho, onde o ponto de ebulição reduzido pela ação de pressão negativa (vácuo), resulta em temperatura inferior a -200°C e aumento da captação do calor da amostra pelo nitrogênio circundante, durante a imersão da amostra e seu continente envasante sem que haja a excessiva formação de bolhas de gás no seu entorno (MARTINO, SONGSASEN e LEIBO, 1996). O esforço compreendido nas tentativas de conseguir mais rápida transferência de calor e maior resfriamento da amostra, tem a intenção de diminuir a excitação química dos constituintes da solução final do citoplasma e facilitar-lhe o alcance ao estado de maior viscosidade e assim operar a prevenção do fenômeno da cristalização e acelerar a vitrificação. Ora, se o volume é importante, assim como a taxa de transferência de temperatura, nada é mais

adequado, do que o proposto no atual experimento: a inserção de uma haste metálica dentro da palheta convencional reduzindo-lhe o volume total da amostra e fixando uma ponte metálica entre a amostra e o nitrogênio circundante; ponte esta com calor específico muito baixo e com alta capacidade condutiva de temperatura, resultando no que ficou patente na análise dos resultados, ou seja: um ganho de sobrevivência superior e estatisticamente significativa.

A transição vítrea

Luyet (1937) descreveu pela primeira vez o emprego da vitrificação em um sistema biológico e coube a Rall e Fahy (1985) utilizá-la pela primeira vez como método de criopreservação de embriões mamíferos. Já em 1984, Rall e Polge destacavam o papel fundamental de que a viscosidade da solução, desempenha na transição do estado líquido ao vítreo ao alcançar a “Temperatura de Transição Vítrea”, denominada de “Tg”. A mudança que ocorre na Tg é simplesmente um rápido incremento na viscosidade e, além disso: “A ‘Tg’ é função da curva de resfriamento”. Também chama a atenção para que em pequenos volumes, precisam de menores temperaturas para atingir a “Tg”. Logo a “Tg” é função da velocidade de decréscimo da temperatura e do tamanho do volume para atingir uma viscosidade que leve a um estágio vítreo. O movimento browniano das moléculas é também dependente dessas duas variáveis; o que leva à consideração de que a viscosidade esperada ao estágio vítreo é dependente de uma transferência de temperatura que faz decair o nível de excitação molecular dos componentes da solução a ser vitrificada. Analogamente coincide que, a passagem pela “IIF Zone” (*intracelular ice formation zone*) apontada por Mazur em 1990, também é facilitada pelas duas variáveis representadas pela velocidade de decréscimo de temperatura associado ao reduzido volume; o que vale tanto para o congelamento convencional quanto para vitrificação. Assim, pouca água e altas osmolaridades dos solutos intracelulares são requeridas para que haja resgate da “IIF Zone”, o que equivale a aumento da viscosidade com baixo movimento browniano das moléculas. Os crioprotetores entram neste contexto; preservando a célula de que a água residual não consiga nuclear e vir a formar expressivos cristais de gelo; coadjuvadamente ao aumento da viscosidade. O problema está esboçado: há que atingir-se um estado de alta viscosidade passando pelos “perigos” de uma nucleação intracelular (pois o *seeding* no congelamento convencional equivale à nucleação extracelular; com citoplasma super-resfriado e com alto potencial químico) utilizando-se para tanto três recursos: 1) diminuição do volume da amostra ao mínimo possível; 2)

aumento da velocidade de resfriamento ao máximo possível; 3) a introdução de crioprotetores para impedir a nucleação e diminuir o volume de água intracelular. Adicionalmente temos o ganho de contar com menos efeitos traumáticos osmóticos no reaquecimento; efeitos próprios desta fase que são o aumento de volume (*swelling*) através do aumento abrupto do volume intracelular pelo rápido influxo de água ou do colapamento parcial (*shrinkage*). O objetivo deste experimento foi determinar a sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificado em palhetas na presença de uma haste metálica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Nos experimentos, foram utilizados animais da espécie *Mus domesticus domesticus*, linhagem CF1 suíça albina. As fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas passaram por um período de 2 semanas de adaptação no biotério. Os machos entre 2 e 10 meses de idade eram mantidos em gaiolas individuais. Os animais ficavam sob ciclo de luz de 14 horas diárias (das 8 às 22 horas) com temperatura regulada em 22 °C e recebiam água e alimento *ad libitum*.

Produção e coleta dos embriões

A superovulação das fêmeas foi induzida através da aplicação de 10UI (0,1mL) de eCG via intraperitoneal, seguida da aplicação de 10UI (0,1 mL) de hCG 46 hs após. Depois da aplicação de hCG, as fêmeas foram colocadas nas caixas individuais dos machos para o acasalamento e a constatação da cópula era feita na manhã seguinte, entre 8 e 9 horas com a verificação do tampão muco gelatinoso vaginal. A coleta dos embriões ocorreu na manhã do quarto dia após a observação da placa vaginal, quando atingiam o estágio de mórula e blastocisto. As doadoras eram sacrificadas por deslocamento cervical, tendo seus cornos uterinos removidos e perfundidos com 0,5 mL de PBSm (Solução salina fosfatada tamponada), sob lupa estereoscópica, com luz incidente e magnitude de 10x, para identificação das estruturas embrionárias. Após, em aumento de 60X os embriões eram selecionados, levando-se em consideração os

critérios morfológicos sugeridos pela IETS (Stringfellow e Seidel, 1998). Um terço dos embriões viáveis coletados de cada doadora, era destinado a cada grupo experimental.

Os embriões do grupo controle foram transferidos para gotas de KSOM e mantidos em estufa a 37°C em atmosfera contendo de 5% O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂ e 100% de umidade relativa do ar.

Haste de metal

Uma haste de metal foi confeccionada em ouro, utilizando-se as medidas da palheta de 0,25 mL, o que permitiu ao mesmo tempo o contato da parte interna da haste com a amostra e a vedação da palheta.

Figura 1: Palheta convencional contendo a haste metálica.



Vitrificação

Os embriões selecionados para vitrificação foram transferidos para uma placa de Petri que continha 200 µL da solução crioprotetora composta por PBSm + 0,4% BSA + 10% EG + 10% PROH onde permaneciam por 2 minutos sob temperatura de 37°C. Após a solução de vitrificação (100µL) constituída de PBSm+0,4% de BSA + 20% EG + 20% PROH, onde permaneciam por 25 segundos. A gota contendo os embriões era então aspirada para dentro da palheta (0,25mL), havendo de imediato a inserção da

haste de ouro na extremidade livre e a imersão em nitrogênio líquido submetido ao vácuo (MARTINO, SONGSASEN e LEIBO, 1996). No outro grupo, os embriões eram submetidos aos mesmos procedimentos acima descritos, sendo as palhetas fechadas com um vedante plástico convencional de identificação. Após a vitrificação as palhetas eram armazenadas em raques mantidas em botijões de nitrogênio líquido.

O aquecimento das amostras foi realizado pela exposição das palhetas ao ar por 10 segundos e imediatamente após o conteúdo foi esvaziado em uma placa de Petri contendo PBS modificado suplementado com 0,25 M de sacarose. Após 5 minutos, os embriões eram transferidos para uma outra placa de Petri contendo somente PBS modificado. Em seguida os embriões eram lavados em gotas de KSOM e transferidos para as gotas de cultivo *in vitro*, onde permaneciam por 48 horas para verificação da sua viabilidade.

Análise Estatística

Os dados relativos à sobrevivência embrionária foram analisados pelo teste de Qui-Quadrado, utilizando-se a tabela de contingência com nível de significância de 0,1%.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os resultados obtidos em 6 replicações. O grupo controle onde foi observada a viabilidade dos embriões coletados, proporcionou uma taxa de sobrevivência, medida pela eclosão dos embriões no cultivo *in vitro*, de 93% atestando a qualidade dos embriões empregados no experimento. A utilização da haste de metal em contato com a amostra propiciou uma taxa de sobrevivência embrionária mais efetiva que a obtida com a palheta tradicional.

Tabela 1: Taxa de eclosão dos embriões vitrificados em palhetas convencionais (0,25mL).

Grupos	Blastocistos	Blastocisto Eclodido	
	N	N	%
I Contole	99	92 ^a	92,93
II Metal	153	86 ^b	56,21
III Sem Metal	138	26 ^c	18,84

a, b, c – p < 0,001.

DISCUSSÃO

Este experimento comprova que se pode utilizar estratégias alternativas à tendência geral de redução de volumes; mantendo-se volumes considerados grandes e obtendo concomitantemente taxas de sobrevivência embrionária altas.

Houve um aumento expressivo na velocidade de congelamento de volumes considerados tecnicamente grandes, se comparados aos experimentais pequenos volumes das OPSs ou das microgotas. Volumes mantidos nas dimensões convencionais; grandes e com a concomitante possibilidade de aceleração da transferência de temperatura demonstrada pela presença de uma haste metálica otimizou as possibilidades de criopreservação. O uso destas “pontes” metálicas conjugadas às palhetas convencionais, e isso vai mudar os conceitos do que é tecnicamente melhor para o uso diário e prático em criopreservação. A taxa de transferência de temperatura depende do calor específico (CE) do material empregado como ponte metálica; sendo a taxa inversamente proporcional ao calor específico. Usamos o Ouro por ter CE = 0,032 e por ter baixa capacidade oxidante. Outros metais como Tungstênio e Aço Inoxidável de uso médico e suas ligas poderão ser cogitados como substitutos mais baratos ao Ouro. A haste metálica poderá ser estruturada de forma a substituir os tampões plásticos de identificação hoje utilizados na oclusão de extremidades das palhetas convencionais. Para tanto será deliberado se estas hastes terão prolongamentos longos que interpenetrem profundamente a luz das palhetas ou

curtos e suficientes para entrar em contato com as amostras. A presença da haste metálica proporcionou, mesmo utilizando-se volumes a priori não recomendados, taxas de sobrevivência embrionária (Tabela 1) que estimulam a formulação e o teste de novas hipóteses que colocarão em confronto a importância do volume da amostra na vitrificação ultra-rápida. O presente estudo contraria Arav (1992), que havia postulado como passos fundamentais a serem desenvolvidos, para a melhoria dos processos de vitrificação existentes a necessidade de se dispor de maiores velocidades de transferência de temperatura, pois na medida em que decresce o volume da amostra aumenta a probabilidade de vitrificação. O percentual da taxa de eclosão no experimento sem metal (18,84%) , baixo se comparado ao obtido com metal (56,21%) pode ser atribuído às baixas concentrações de crioprotetores utilizadas considerando os grandes volumes envolvidos nestes procedimentos.

Kasai (2002) cita que a palheta plástica de inseminação artificial de 0,25mL é amplamente usada; seu volume é relativamente pequeno, que quando exposto diretamente ao nitrogênio líquido, ou quando aquecido em banho-maria a 37°C, a curva de resfriamento e de aquecimento, entre -25 e -175°C, chega a aproximadamente 2.500°C/min. O autor ressalta que a prevenção mais efetiva da cristalização dependeria de maior aceleração na troca de temperatura, e cita as experiências de Hochi *et al.* (2001) que a velocidade ótima de resfriamento estaria em torno dos 3.000°C/min..

Temos então os seguintes ganhos objetivos advindos do experimento: 1) uma velocidade de resfriamento acima dos convencionais 2.500°C/min; 2) uma modulação do volume da amostra que depende da espessura da haste metálica que ocupa o espaço interno da palheta convencional e, assim, possibilita adequar o volume da amostra e preencher o restante da palheta na presença da haste de metal; 3) a capacidade física de distensão da paredes da palheta convencional na passagem dos -130°C, quando há a mudança do estado líquido para o vítreo, diminuindo as chances de fratura da amostra que oferecem as palhetas metálicas e dispensando o artifício de diminuir a velocidade de decréscimo da temperatura ao redor dos -130°C, o que frustraria a curva em aumento acelerado de troca de calor que se deseja neste ponto.

Sob estes três pontos de análise a experiência realizada mostra a satisfação de todos estes requisitos e demonstra ser um método eficiente, possibilitando ser incorporado às biotécnicas de criopreservação como uma solução, para a melhoria dos resultados de sobrevivência embrionária advindos das técnicas de vitrificação.

CONCLUSÃO

A inclusão de uma haste metálica no interior da amostra de embriões vitrificados contida em uma palheta convencional de 0,25 mL propiciou uma taxa de sobrevivência embrionária superior ao obtido no grupo em que a amostra não teve contato com a peça metálica.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Focalizando os problemas valorizamos as soluções. Assim é que temos como problemas na vitrificação a velocidade de resfriamento até que se chegue aos -130°C que caracteriza a temperatura de vitrificação dos meios em geral hoje utilizados. Outro problema sempre lembrado é o de evitar as fraturas que podem ocorrer na amostra devido a rigidez das paredes dos vasilhames utilizados na vitrificação, sejam eles micropipetas de vidro ou palhetas totalmente metálicas (estas com o inconveniente de não permitirem a observação do seu conteúdo por transparência); assim o dispositivo ora idealizado e levado a efeito na forma de uma haste metálica que insere-se no interior de uma palheta convencional, disponibiliza ao usuário a transparência das paredes possibilitando a observação da amostra assim como a flexibilidade lembrada por Kasai (2002). A manutenção do volume da amostra em uma palheta convencional tem características de uso corrente na reprodução animal, que com certeza, no momento em que as taxas de sobrevivência embrionária forem compatíveis com os custos econômicos, tornar-se-á a técnica de eleição para emprego na indústria da transferência de embriões.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAV, A. Vitrification of oocyte and embryos. In: Embryonic development and manipulation in animal production. **Proceedings** Portland, University of Portland, p. 255-264, 1992.
- DINNYÉS, A. *et al.* High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 513-518, 2000.
- HOCHI, S. *et al.* Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro-matured bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 41, p. 69-73, 2001.
- JACKOWSKI, S.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. **Journal of Experimental Zoology**, v. 212, p. 329-341, 1980.
- KASAI, M. Simple and efficient methodos for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 67-75, 1996.
- KASAI, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. **Reproduction Medicine and Biology**, v. 1, p. 1-9, 2002.
- LANDA, V. Protection of non-cellular investments of rabbit morulae stored at -196°C. **Folia Biologyc**, v. 28, p. 350-358, 1982.
- LANDA, V.; TEPLA, O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. **Folia Biology**, v. 36, p. 153-158, 1990.
- LANE, M. *et al.* Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 1234-1236, 1999.
- LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W. B.; GARDNER, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertil. Steril.**, v. 72, p. 1073-1078, 1999.
- LE GAL, F.; MASSIP, A. cryopreservation of cattle oocytes: effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and vitrification procedure. **Cryobiology**, v. 38, p. 290-300, 1999.
- LEIBO, S. P.; McGRATH, J. J.; CRAVALHO, E. G. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. **Cryobiology**, v. 15, p. 257-271, 1978.
- LEIBO, S.P. A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. **Cryo-Letters**, v. 4, p. 387-400, 1983.
- LUYET, B.J. The vitrification of colloids and of protoplasm. **Biodynamica**, v. 39, p. 1-14, 1937.

- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 1059-1069, 1996.
- MATSUMOTO, H. *et al.* Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, p. 139-144, 2001.
- MAZUR, P. Equilibrium, quase-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophysics**, v. 17, p. 53-92, 1990.
- MUKAIDA, T. *et al.* Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of cryloop containerless technique. **Fertility Steril**, v.76, p. 618-620, 2001.
- NOWSHARI, M.A.; BREM, G. Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. **Human Reproduction**, v. 16, p. 2368-2373, 2001.
- PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. A highly efficient modified vitrification method, for day 3 in vitro produced bovine embryos. **Cryo-Letters**, v. 20, p. 203-206, 1999.
- PARK, S.E. *et al.* Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxol, a cytoskeleton stabilizer. **Fertility Steril**, v. 75, p. 1177-1184, 2001.
- PEDRO, P.B. *et al.* Effects of osmotic shrinkage on the survival of mouse oocytes and embryos at various developmental stages. **Journal Mammalian Ova Research**, v. 14, p. 66-71, 1997.
- RALL, W. F.; REID, D. S.; POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. **Cryobiology**, v. 21, p. 106-121, 1984.
- RALL, W. F.; POLGE, C. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 285-292, 1984.
- RALL, W. F.; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, v. 313, p. 573-575, 1985.
- RALL, W.F.; MEYER, T.K. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. **Theriogenology**, v.31, p. 683-691, 1989.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, M.S. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões. 3ª Edição, p.171-174, 1998.
- TOMINAGA, K.; HAMADA, Y. Gel-loading tip as container for vitrification in vitro-produced bovine embryos. **Journal of Reproduction Development**, v. 47, p. 259-265, 2001.
- VAJTA, G. *et al.* Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-Lett**, v. 18, p. 191-195, 1997.

VAJTA, G. *et al.* Sterile application of open pulled straw (OPS) vitrification method. **Cryo-Letters**, v. 19, p. 389-392, 1998.

VAJTA, G. *et al.* In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrification with the open-pulled straw method. **Veterinary Records**, v. 144, p. 180-181, 1999.

WALKER, D.J.; CAMPOS-CHILLON, L.F.; SEIDEL, G.E. Vitrification of in vitro-produced bovine embryos by addition of ethylene glycol in one-step. **Reproduction in Animal Domestic**, v. 41, p. 467-471, 2006.

WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . **Science**, v. 178, p. 411-414, 1972.