

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

VITRIFICAÇÃO DE BLASTOCISTOS *Mus domesticus domesticus* EXPOSTOS À  
SOLUÇÃO CRIOPROTETORA COM DIMETILFORMAMIDA E ENVASE EM  
MICROCAPILARES PRODUZIDOS INDUSTRIALMENTE

PAULA RODRIGUEZ VILLAMIL

PORTO ALEGRE

2009

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

VITRIFICAÇÃO DE BLASTOCISTOS *Mus domesticus domesticus* EXPOSTOS À  
SOLUÇÃO CRIOPROTETORA COM DIMETILFORMAMIDA E ENVASE EM  
MICROCAPILARES PRODUZIDOS INDUSTRIALMENTE

Autor: Paula Rodriguez Villamil

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

2009

Não é na ciência que encontramos a felicidade,  
senão em sua aquisição.

*Edgar Allan Poe*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. José Luiz Rodrigues pela oportunidade de realizar este projeto, pelos ensinamentos e contribuições na minha formação, apoio e orientação deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação da UFRGS e seu corpo docente por sua alta qualificação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos para a realização do curso de mestrado.

A toda minha família, e em especial a meus pais e meu irmão por me animar a realizar e nunca desistir de meus sonhos.

Ao Felipe Ledur Ongaratto por sua compreensão, paciência, apoio e total colaboração ao longo deste trabalho e quem foi a força para não desistir.

Aos colegas do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução: Daniela Scherer da Silva, Andrea Gianioti, Sabrina Lorenzoni Gomes, Cristiano Feltrin, Liziane Ferraresi e Natália Schmidt, por seu apoio incondicional e amizade.

Aos Bolsistas do Laboratório Leonardo Malta, Otávio Sicco e Letícia Schmidt e aos funcionários Leda e João Roberto por sua enorme colaboração.

## RESUMO

Os objetivos dos experimentos foram primeiro testar a presença da dimetilformamida (DF) nas soluções crioprotetoras e segundo avaliar a viabilidade *in vitro* pós aquecimento de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em microcapilares manufacturados industrialmente. O primeiro experimento testou a capacidade de vitrificação das diferentes soluções de vitrificação, compostas pelas combinações de etileno glicol (EG) ou 1-2 propanediol (PROH) com as diferentes porcentagens de DF. No segundo experimento se testou a toxicidade de 3 soluções de equilíbrio: **ES1** (PBSm + 10% PROH + 10% DF + 0.5% PVA), **ES2** (PBSm+ 10% EG+ 10% DF + 0.5% PVA), **ES3** (PBSm + 10% PROH + 10% EG + 0.5% PVA), através da exposição dos embriões durante 3 períodos de tempo (1, 3 e 10 min). O cultivo *in vitro* após a exposição às soluções de equilíbrio foi realizado em meio de KSOM durante 72 h. Os resultados de re-expansão foram semelhantes entre as três soluções, quando os embriões foram expostos por 1 ou 3 min. Por outro lado, a exposição à **ES3** por 10 min, revelou uma maior taxa de sobrevivência dos embriões, em relação às outras soluções testadas. No terceiro experimento, após expor-se os embriões às soluções de equilíbrio, **ES1**, **ES2** e **ES3** por 1 min, a vitrificação foi realizada utilizando-se as seguintes soluções: **VS1** (PBSm + 20% PROH + 20% DF + 0.5% PVA); **VS2** (PBSm + 20% EG + 20% DF+ 0.5%PVA) and **VS3** (PBSm + 20% EG + 20% PROH + 0.5% PVA). Imediatamente após a exposição por 30 s às soluções de vitrificação os embriões foram envasados em micropipetas de vidro (GMPs) e mergulhados em nitrogênio líquido superresfriado. As GMPs foram aquecidas no ar durante 10 s e após os embriões foram expostos durante 5 min ao PBSm + 0,25 M sacarose a 37 °C, finalmente transferidos para gotas de meio KSOM e cultivados *in vitro* durante 72 horas. As taxas de re-expansão dos embriões após o cultivo *in vitro* foram as seguintes: **ES1/VS1** = 12% (13/108); **ES2/VS2** = 38% (46/111) e **ES3/VS3** = 84% (89/105). A eclosão dos embriões observada após o cultivo *in vitro* foi de: **ES1/VS1** = 3% (3/108); **ES2/VS2** = 17% (19/111) e **ES3/VS3** = 70% (73/105). As taxas de sobrevivência revelaram que a presença da dimetilformamida na solução crioprotetora reduz a viabilidade embrionária e que a associação de EG + PROH é eficiente na manutenção da viabilidade embrionária após a vitrificação. O segundo artigo descreve os experimentos de vitrificação,

utilizando-se para o envase dos embriões um microcapilar de vidro (GMC), produzido industrialmente (Brand®). Blastocistos murinos após a coleta foram divididos em três grupos: Controle, embriões cultivados *in vitro* em KSOM por 72 horas; Grupo 1, vitrificados envasados em micropipetas de vidro (GMPs) esticadas manualmente; Grupo 2, vitrificados envasados nas GMCs (Brand® - 5 µL). O procedimento de vitrificação foi o seguinte: primeiro os embriões foram expostos à solução de equilíbrio (PBSm + 10% EG + 10% PROH and 0.5% PVA) por 1 min e após transferidos para a solução de vitrificação (PBSm + 20% EG + 20% PROH + 0.5% PVA) por 30 s, envasados nas GMPS ou GMCs e imediatamente mergulhados em nitrogênio superresfriado. As taxas de sobrevivência dos embriões após o aquecimento e cultivo *in vitro*, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. O envase dos embriões nas GMCs proporcionou sobrevida embrionária similar à observada nos embriões envasados nas GMPs.

Palavras chaves: camundongo, blastocisto, vitrificação, dimetilformamida, microcapilares.

## ***ABSTRACT***

The aims of these experiments were first, determine the effect of dimethylformamide (DF) into cryoprotectant solutions and secondly, evaluated the *in vitro* viability of blastocyst *Mus domesticus domesticus* vitrified into glass microcapillaries (Brand®). The first article described the efficiency of DF in association with ethylene glycol (EG) and 1-2 propanediol (PROH) on *in vitro* viability of vitrified mouse blastocysts. Initially, the different cryoprotectant solutions were tested on its capacities to induce virification. In the second experiment to determine the cryoprotectant toxicity the embryos were exposed during 1, 3 and 10 min to three different equilibrium solutions **ES1** (PBSm + 10% PROH+ 10% DF + 0.5% PVA), **ES2** (PBSm+10% EG+ 10% DF + 0.5% PVA), **ES3** (PBSm + 10% PROH + 10% EG + 0.5% PVA). After 72 hours of *in vitro* culture in KSOM medium, re-expansion and hatching rates showed no differences among the tested cryoprotectant solutions for 1 or 3 min exposition interval time. However, for the 10 min exposition interval time, **ES3** was more effective to promote embryo survival than the others tested cryoprotectant solutions. In the third experiment, blastocysts were vitrified after been exposed to one of the equilibrium solutions (**ES1, ES2 or ES3**) during 1 min. After that the embryos were transferred to one of the vitrification solutions (**VS1** = PBSm + 20% PROH + 20% DF+ 0.5% PVA; **VS2** = PBSm + 20% EG+ 20% DF+ 0.5% PVA and **VS3** = PBSm + 20% EG+ 20% PROH+ 0.5% PVA) during 30 s, loaded into glass micro pipettes (GMPs) to be plunged into super-cooled liquid nitrogen. The GMPs were thawed in air during 10 s, transferred into drops of PBSm + 0,25 M sucrose at 37 °C for 5 min, and finally transferred to KSOM medium for *in vitro* culture. After 72 hours the expansion and hatched rates were evaluated. Results demonstrated a significantly difference between the vitrification solutions, showing better hatching rates the embryos vitrified into the ES3/EV3 solution. Therefore, these data shows that the cryoprotectants solutions containing dimethylformamide have deleterious effects on the developmental competence of vitrified mouse blastocysts, and the highest expansion and hatching rates were obtained when the cryoprotectant solution containing an EG and PROH association. The purpose of the second study was to determine the *in vitro* expansion and hatching rates of vitrified mouse blastocysts loaded into commercially available glass micro-capillaries (GMC - Brand®5

μL). In the early morning at day 4 of the pregnancy, collected blastocysts were divided in three groups: Control: embryos were *in vitro* culture during 72 hours into KSOM medium; Group 1, blastocyst vitrified into glass micropipettes (GMP); Group 2, blastocyst vitrified into GMC. The embryos were first exposed to the equilibrium solution (PBSm + 10% EG + 10% PROH + 0.5% PVA) for 1 min and then transferred into the vitrification solution (PBSm + 20% EG + 20% PROH + 0.5% PVA) for 30 sec. Blastocysts were loaded into GMP or GMC and plunged into super-cooled liquid nitrogen. Embryo warming was carried out by plunging the narrowest end of the capillaries into droplets of 0.25 M sucrose maintained at 37°C. After 5 min, embryos *in vitro* culture into KSOM medium for 72 hours. Blastocyst survival rates did not show significant differences between the groups. The tested manufactured GMC (Brand®) showed the same efficiency as the GMP to load mouse blastocysts for vitrification.

Keywords: Mouse, blastocyst, vitrification, dimethylformamide, glass micro-capillaries.



## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µL	microlitro (s)
µm	Micrometro
°C	graus Celsius
Bl	Blastocisto
Be	blastocisto eclodido
Bi	blastocisto inicial
Bx	blastocisto expandido
BSA	albumina sérica bovina (bovine serum albumin)
cm	centímetro (s)
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
ECG	gonadotrofina coriônica eqüina
EG	Etilenoglicol
ES	solução de equilíbrio
GLY	Glycerol
GMP	micropipeta de vidro (glass micropipette)
hCG	gonadotrofina coriônica humana
H	hora (s)
ICM	células do botão embrionário (inner cell mass)
kg	quilograma(s)
KSOM	meio de cultivo simplificado acrescido de potássio
M	Molar
MC	Microcapilar
MDS	mínimo tamanho da gota (minimum drop size)
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	mililitro (s)

mm	milímetro (s)
mOsm	miliosmol (s)
N	Número
N <sub>2</sub> L	nitrogênio líquido
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OPS	palhetas esticadas abertas (open pulled straw)
PBSm	solução salina fosfatada tamponada modificada
pH	potencial hidrogeniônico
PM	peso molecular
PROH	1,2-propanediol
PVA	álcool polivinílico
PVP	polivinil-pirrolidone
SE	solução equilíbrio
SD	solução de desidratação
SV	solução de vitrificação
s	Segundos
SN <sub>2</sub>	nitrogênio ultraresfriado
TE	transferência de embrião (ões)
UI	unidade internacional
VS	solução de vitrificação
v/v	volume/volume
w/v	peso/volume

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Table 1. Occurrence of vitrification state for different solutions during cooling and warming.....	40
Table 2. Embryo re-expansion and hatching rates after exposure to three different time intervals to the equilibration solution (5 replicates)....	41
Table 3. Embryo re-expansion and hatching rates after vitrification.....	42
Table 4. Mean of mouse blastocyst inner cell mass (ICM), trophoectoderm (TE) and total cell number.....	43

### ARTIGO 2

Table 1. Embryo re-expansion and hatching rates after after vitrification in two different containers.....	55
Table 2. Mean of mouse blastocyst inner cell mass (ICM), trophoectoderm (TE) and total cell number.....	56

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Vitrificação.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Crioprotetores.....</b>	<b>19</b>
2.1.1.1	Crioprotetores de ação intracelular.....	19
2.1.1.2	Crioprotetores de ação extracelular.....	23
2.1.1.3	Associações de crioprotetores.....	24
2.1.1.4	Procedimentos de adição e retirada dos crioprotetores.....	26
<b>2.1.2</b>	<b>Recipientes para o envase dos embriões.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Nitrogênio superresfriado.....</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>Artigos.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.</b>	<b>Mouse blastocysts vitrification using a cryoprotectant solution containing dimethylformamide.....</b>	<b>33</b>
	Abstract.....	33
	Introduction.....	35
	Material and Methods.....	36
	<i>Vitrification test solutions.....</i>	<i>37</i>
	<i>Production of mouse embryos.....</i>	<i>37</i>
	<i>Toxicity test of vitrification solutions.....</i>	<i>38</i>
	<i>Vitrification and warming procedure.....</i>	<i>38</i>
	<i>Assessment in vitro development .....</i>	<i>39</i>
	<i>Differential ICM and TE cell counts .....</i>	<i>39</i>
	Statistical analysis.....	39
	Results.....	40
	Discussion.....	44
	Conclusion.....	47
	References.....	47
<b>3.2.</b>	<b>Survival of mouse blastocyst vitrified loaded into glass capillaries</b>	<b>50</b>

	Abstract.....	50
	Introduction.....	51
	Material and Methods.....	52
	<i>Production of mouse embryos.....</i>	52
	<i>Preparation of GMP and GMC characteristics.....</i>	53
	<i>Vitrification procedure.....</i>	53
	<i>Embryo warming and cryoprotectant dilution.....</i>	54
	<i>Assessment in vitro development .....</i>	54
	<i>Differential ICM and TE cell counts .....</i>	54
	Statistical analysis.....	54
	Results.....	55
	Discussion.....	57
	Conclusion.....	58
	References.....	59
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>71</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de gametas e embriões é uma ferramenta empregada nos últimos 60 anos na reprodução assistida de diferentes espécies mamíferas, primeiro com o sêmen (POLGE *et al.*, 1949) e mais recentemente com embriões (WHITTINGHAM *et al.*, 1972; WILMUT, 1972).

Atualmente a vitrificação de embriões murinos, que foi descrita por Rall e Fahy (1985), é uma das alternativas técnicas para a crioconservação de embriões, principalmente aqueles produzidos *in vitro*. A vitrificação de maneira geral consiste na transformação do estado líquido em vítreo pela exposição a baixas temperaturas, produzida não pela cristalização, mas por uma extrema elevação na viscosidade durante o resfriamento. O fenômeno mantém a distribuição molecular e iônica que existia no estado líquido, antes do resfriamento (FAHY *et al.*, 1987).

Massip (2001) já destacava que os efeitos deletérios das soluções de vitrificação serão limitados com a seleção e mistura criteriosa dos crioprotetores. Dessa forma analisando as características próprias de cada crioprotetor percebe-se que independente da capacidade de cada um deles em induzir à formação do estado vítreo, todos apresentam diferentes graus de toxicidade às células embrionárias (KASAI *et al.*, 1990; MASSIP, 2001; VAJTA e NAGY, 2006).

Diferentes amidas, como a acetamida e a formamida, já foram utilizadas na composição da solução de vitrificação de oócitos e de embriões de mamíferos e peixes (RALL e FAHY, 1985; JANIK *et al.*, 2000; FAHY *et al.*, 2004). Neste cenário de busca de novas soluções crioprotetoras, pode-se especular o emprego da dimetilformamida (DF), potente indutor do estado vítreo, utilizada na composição de diluentes para a crioconservação de sêmen em bovinos (GONZALES, 2004), em caprinos (FERREIRA *et al.*, 2006), em caninos (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e em eqüinos (VIDAMENT *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2004; ALVARENGA *et al.*, 2005).

Outro ponto de interesse a ser estudado é o envase dos embriões para a criopreservação. Além de proporcionar resultados favoráveis o envase dos embriões deve solucionar de maneira satisfatória, outros dois aspectos importantes para a vitrificação, que são a facilidade de manipulação e a correta identificação das amostras criopreservadas.

Os objetivos dos experimentos foram testar a presença da dimetilformamida nas soluções crioprotetoras e avaliar a viabilidade *in vitro* pós-aquecimento de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em microcapilares manufacturados industrialmente.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A organização e a utilização como rotina de um modelo experimental, permitiu que Stefani (1983) obtivesse os primeiros nascimentos no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a partir das transferências de embriões *Mus domesticus domesticus*. Este trabalho propiciou o início das atividades de pesquisas na área da criopreservação de embriões, envolvendo outras espécies domésticas, como por exemplo, o *Bos taurus taurus* (GREGORY e RODRIGUES, 1985).

Posteriormente Lopes e Rodrigues (1988) vitrificaram embriões murinos nos estádios de mórula, blastocisto inicial e blastocisto, utilizando como solução crioprotetora uma combinação de PBSm + 25% glicerol (GLY) + 25% 1,2-propanediol (PROH). Após a transferência dos embriões para fêmeas receptoras as taxas de implantação foram de 27,5% (22/80), 13,75% (11/80) e 5% (4/80), respectivamente. Diferentes experimentos foram conduzidos procurando identificar soluções crioprotetoras adequadas, associadas aos envases que permitissem a sobrevivência embrionária (ANDRADE e RODRIGUES, 1987; PALHA *et al.*, 1991; HOTZEL e RODRIGUES, 1992; BERTOLINI *et al.*, 1994; AGUIAR *et al.*, 1997; CÔRTEZ e RODRIGUES, 2000; BERTOLINI *et al.*, 2005; ASSAF *et al.*, 2007; COSTA, 2007)

Recentemente Vieira *et al.* (2008), adotaram como envase de embriões bovinos para

a vitrificação a micropipeta de vidro (GMP), com a utilização de microvolumes de crioprotetor e a exposição ao nitrogênio líquido superresfriado (SN<sub>2</sub>) (-200 °C), que além de proporcionar aumento nas taxas de resfriamento, também permite a redução da concentração dos crioprotetores. Nivia (2008) realizou a comparação do envase em macrovolume empregando palhetas com uma haste de ouro com o envase em microvolume, utilizando as GMP. Os resultados revelaram que a vitrificação dos blastocistos murinos, previamente desidratados por 3 min, foi mais eficiente em promover a sobrevivência dos envasados nas GMP (60% ; 52/86) do que os mantidos nas palhetas com a haste de ouro (4% ; 2/57).

Lange (2008) avaliou a taxa de sobrevivência de embriões murinos nos estágios de 2-células, 8-células e blastocisto, envasados em GMPs e vitrificados pela imersão em nitrogênio superresfriado, após 1 min de desidratação em solução crioprotetora constituída por PBSm +10% EG + 10% PROH + 0.5% PVA, seguida da exposição por 30 s à solução de vitrificação (PBSm + 20% EG + 20% PROH + 0,5% PVA). As taxas de eclosão *in vitro* dos embriões vitrificados nos estágios de 2-células, 8-células e blastocistos, foram de 53,1% (60/113), 76,9% (117/152) e 68,3% (97/142), respectivamente.

## 2.1 Vitrificação

A vitrificação é uma técnica de criopreservação, definida por Fahy *et al.* (1984) como um processo que permite à uma solução alcançar o estado vítreo, pela extrema elevação da viscosidade durante o resfriamento sem a ocorrência de cristalização. As curvas de resfriamento são mais rápidas em comparação as do congelamento e usualmente são associadas à utilização de soluções crioprotetoras mais concentradas. A formação do estado vítreo promove a distribuição iônica do líquido, o que impede a formação de cristais de gelo nos espaços intra e extracelulares, reduzindo a ocorrência de danos químicos e mecânicos durante o resfriamento (RALL e FAHY, 1985; ARAV, 1992; KASAI, 2002).

No entanto, a ausência da formação de cristais de gelo, não exclui a possibilidade da ocorrência de danos celulares, como por exemplo, de origem tóxica ou osmótica. De acordo



com Fahy (2007) existem três tipos de efeitos tóxicos dos crioprotetores sobre as células embrionárias, o primeiro é a denominada toxicidade específica que é própria de cada agente crioprotetor. Os efeitos químicos, através de vias e sítios celulares definidos, destroem a estrutura celular (p.e. organelas e membranas biológicas) e impedem processos enzimáticos vitais (p.e. alteração hidrofóbica da membrana, mudança da constante dielétrica, potencial redox, força iônica, pH, tensão de superfície); o segundo é a toxicidade indireta mediada pelas alterações na localização da água nas moléculas hidratadas; e o terceiro é o da desnaturação de proteínas.

As lesões tóxicas são observações comuns no processo de vitrificação de embriões, devido à necessidade do uso de altas concentrações de crioprotetores. O grau de toxicidade das soluções crioprotetoras vai depender das propriedades dos crioprotetores, somadas ao tempo e à temperatura de exposição (FAHY *et al.*, 2004; BERTOLINI *et al.*, 2005).

Por sua vez as lesões osmóticas são originadas por alterações do volume celular durante a adição e a diluição das soluções crioprotetores às células embrionárias (KASAI, 2002). A desidratação excessiva causa redução exagerada do volume das células e resulta no denominado efeito da solução, que se caracteriza pela precipitação dos componentes celulares (MAZUR, 1966). O aumento exagerado do volume celular é observado mais comumente durante o processo de retirada da solução crioprotetora das células, após o aquecimento. Na presença de meios isotônicos, a difusão da água extracelular através das membranas celulares é mais rápida que a saída dos crioprotetores, o que pode causar lesões das membranas e organelas celulares (MAZUR, 1970). A estratégia de prevenção usualmente empregada é utilizar soluções hipertônicas com macromoléculas, como por exemplo, a sacarose (KASAI e MUKAIDA, 2004). De acordo com Vajta e Nagy (2006) estas alterações celulares podem ser controladas através do emprego de curvas de resfriamento mais rápidas e soluções crioprotetoras mais estáveis e menos tóxicas.

### 2.1.1. Crioprotetores

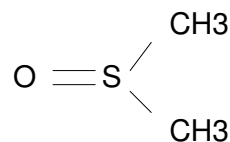
De acordo com Mazur (1980), as células mamíferas, independente do grau de desidratação, não sobrevivem a congelamentos abaixo dos  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  em fluídos teciduais ou soluções salinas, sem a presença de um crioprotetor. Portanto, independente da velocidade de resfriamento adotada na criopreservação de embriões, a adição de um crioprotetor é fundamental para a sobrevivência das células embrionárias.

Os crioprotetores utilizados na vitrificação são os mesmos do congelamento, porém em maiores concentrações, pois alcançar o estado vítreo exige maior viscosidade das soluções (KASAI e MUKAIDA, 2004; WOODS *et al.*, 2004). Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos, levando-se em consideração a permeabilidade à membrana celular: os intracelulares que permeiam a membrana e exercem sua ação no interior das células embrionárias e os extracelulares que agem sobre a membrana celular sem ultrapassá-la (KASAI e MUKAIDA, 2004; VAJTA e NAGY, 2006; PEREIRA e MARQUES, 2008).

#### 2.1.1.1. Crioprotetores de ação intracelular.

Os crioprotetores intracelulares são importantes constituintes da solução de vitrificação, sendo a presença intracelular essencial na prevenção da formação de cristais de gelo, impedindo também a ocorrência de danos tóxicos e osmóticos (KASAI, 2002). Os principais crioprotetores intracelulares utilizados na embriologia experimental e comercial são o DMSO, EG, GLY, PROH e as amidas.

*-Dimetil sulfoxido (DMSO)*



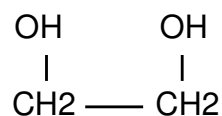
O DMSO é um dos crioprotetores intracelulares com alto peso molecular

(PM=78.13) e foi a sua facilidade em induzir o estado vítreo, que o levou a ser um dos primeiros crioprotetores utilizados nas soluções de vitrificação de embriões (BAUDOT *et al.*, 2000).

O DMSO preserva a integridade de proteínas isoladas e das membranas lipídicas durante o processo de resfriamento e aquecimento (ANCHORDOGUY *et al.*, 1991). Essa característica faz com que seja o crioprotetor de eleição na vitrificação de células e tecidos, quando comparado com crioprotetores de menor peso molecular (DE LA TORRE e STANLEY, 2007). Um dos exemplos da eficácia do DMSO na criopreservação de gametas é o trabalho de Wood *et al.* (1993), que avaliaram a sobrevivência *in vivo*, pós fecundação e cultivo *in vitro* de ovócitos de camundongo vitrificados após exposição à solução crioprotetora que continha 6.0 M de DMSO. A transferência dos embriões no estágio de 2-células, para as fêmeas receptoras sincronizadas, proporcionou taxas de implantação de 79% (190/240) no grupo dos ovócitos vitrificados e de 84% (134/160) no grupo controle. O número de fetos observados foi maior no grupo controle 61% (98/160) em comparação ao obtido no grupo dos ovócitos vitrificados 40% (96/240). Vale a pena ressaltar que no grupo dos ovócitos vitrificados a perda pós implantação foi de 49%, significativamente maior que os 27% observados no grupo controle.

A desvantagem do DMSO é a toxicidade, além da dificuldade de seu emprego, já que apresenta a necessidade de preparo da solução no momento do uso, em função de sua característica higroscópica, o que prejudica sua aplicação nas rotinas de criopreservação (WERLICH *et al.*, 2006).

- Etileno Glicol (EG)



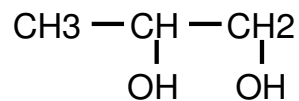
O EG é um dos crioprotetores intracelulares com menor peso molecular (PM= 62.02) e maior permeabilidade à membrana celular, o que lhe proporciona uma vantagem

quando comparado a outros crioprotetores intracelulares de maior peso molecular, como o DMSO e o GLY. Além disto, é um dos crioprotetores de menor toxicidade às células embrionárias, utilizado com efetividade no congelamento (MIYAMOTO e ISHIBASHI, 1978) e vitrificação de embriões murinos (RALL e FAHY, 1985; EUM *et al.*, 2008), bovinos (VAJTA *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2008), suínos (CUELLO *et al.*, 2008).

O EG tem rápida difusão através das membranas, o que determina tempos reduzidos de exposição necessários para seu equilíbrio intracelular, além disso estabiliza a membrana celular durante o processo de vitrificação (KASAI *et al.*, 1990). De acordo com Sommerfeld e Niemann (1999) pode ser utilizado em concentrações que variam entre 1,8 e 8,9 M, sem causar danos nas células ou sobre a capacidade de desenvolvimento dos embriões.

As vantagens acima descritas fazem do EG um dos crioprotetores mais utilizados na formulação das soluções de vitrificação, podendo ser utilizado em combinação com outros crioprotetores intracelulares (CÔRTEZ e RODRIGUES, 2000; EMILIANI *et al.*, 2000; LIEBERMANN *et al.*, 2002; VAJTA e KUWAYAMA, 2006; ASSAF *et al.*, 2007; VIEIRA *et al.*, 2008).

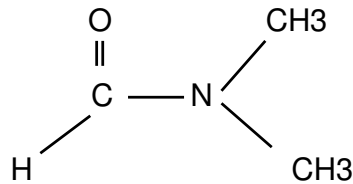
- 1-2 Propanediol (PROH).



O PROH é outro crioprotetor com alta capacidade de vitrificação e peso molecular menor (PM=76.10) quando comparado com o DMSO. Na comparação com outros crioprotetores se apresenta mais estável no estado amorfo e evita danos no fuso meiótico. Essas características lhe têm permitido ser utilizado na vitrificação de ovócitos bovinos, substituindo o DMSO como crioprotetor intracelular nas soluções de vitrificação (BOUTRON, 1984; FULLER e PAYNTER, 2004; CHIAN *et al.*, 2004). Na vitrificação de embriões murinos tem sido utilizado associado ao GLY ou EG (ISHIMORI *et al.*, 1992;

CSEH *et al.*, 1999).

-Dimetilformamida (DF)



A Dimetilformamida (DF) é um crioprotetor com baixo peso molecular (PM= 73,1), quando comparado com o DMSO e PROH. Pertence ao grupo das amidas, potente bloqueador da toxicidade do DMSO (FAHY *et al.*,1984). Sua configuração química apresenta três sítios de ligação do hidrogênio, que permite a ligação com as moléculas de água, aumentando a solubilidade e proporcionando maior permeabilidade à membrana celular (BAUDOT e BOUTRON, 1998; FULLER e PAYNTER, 2004). Da mesma forma, essa união com as moléculas de água proporciona um aumento na capacidade de indução do estado vítreo (BAUDOT e BOUTRON, 1998).

Diferentes experimentos têm revelado vantagens na criopreservação de tecidos e células com a presença das amidas na solução crioprotetora, tais como de monócitos (TAKAHASHI *et al.*, 1986), córnea humana (BOURNE e NELSON, 1994), ovários de camundongo (MIGISHIMA *et al.*, 2003) e ovários ovinos (BAUDOT *et al.*, 2007).

A DF por possuir um maior número de grupos metilo é uma molécula mais estável e com maior capacidade crioprotetora, uma vantagem frente às demais amidas anteriormente utilizadas na vitrificação como acetamida e formamida (FAHY *et al.*, 1987).

A utilização das amidas também é relatada na congelação (OGAWA *et al.*, 1977) e na vitrificação (RALL e FAHY, 1985; NAKAO *et al.*, 1997, PEDRO *et al.*, 2005) de embriões murinos, assim como na vitrificação de embriões de rato (KONO *et al.*, 1988), humano (MUKAIDA *et al.*, 1998), bovino (FUKU *et al.*, 1995; SIQUEIRA-PYLES *et al.*,

2004), suíno (YOSHINO *et al.*, 1993) e peixes (CHEN e TIAN, 2005; DING *et al.*, 2007; LAHNSTEINER, 2008).

A DF também se caracteriza por apresentar eficiência na crioconservação de sêmen de diferentes espécies como bovinos (GONZALES, 2004), caprinos (FERREIRA *et al.*, 2006), caninos (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e eqüinos (SQUIRES *et al.*, 2004; ALVARENGA *et al.*, 2005).

#### 2.1.1.2. Crioprotetores de ação extracelular

Os crioprotetores extracelulares são agentes de alto peso molecular, macromoléculas, que não permeiam a membrana celular. Dois tipos de substâncias caracterizam esses crioprotetores, os polímeros e os sacarídeos:

As macromoléculas são adicionadas às soluções de vitrificação para promover modificações na viscosidade, facilitando a indução do estado vítreo. A presença de macromoléculas age também, de forma indireta, na redução da toxicidade da solução crioprotetora, pela exigência de uma menor concentração dos crioprotetores intracelulares (KASAI e MUKAIDA, 2004).

##### - Polímeros

O primeiro polímero utilizado na composição das soluções de vitrificação foi o polietileno glicol (RALL e FAHY, 1985). Outros polímeros menos tóxicos, também são utilizados na vitrificação de embriões mamíferos, como por exemplo a polivinil pirrolidona (PVP) (LEIBO e ODA, 1993; WOWK *et al.*, 2000), dextran (SHAW *et al.*, 1997; KULESHOVA *et al.*, 2001), e o álcool polivinílico (PVA) (ASADA *et al.*, 2002; CHECURA e SEIDEL, 2007). Porém, o emprego de macromoléculas como substituto dos crioprotetores intracelulares na composição das soluções de vitrificação ainda não oferece resultados satisfatórios (KULESHOVA *et al.*, 2001). A combinação mais comumente utilizada destes polímeros na vitrificação de embriões murinos é a proposta por Kasai *et al.*

(1990), que inclui EG, Ficoll e sacarose (EFS).

- *Sacarídeos*

Compostos por mono e dissacarídeos, são crioprotetores extracelulares capazes de preservar a estrutura e a integridade funcional da membrana celular (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996). Diminuem os efeitos osmóticos e tóxicos ao promover a desidratação e a vitrificação intracelular, assim como reduzem a concentração de crioprotetor dentro da célula (KASAI e MUKAIDA 2004; LIEBERMANN *et al.*, 2002). Os sacarídeos mais efetivos são a sacarose, glicose, galactose, rafinose, trealose (KASAI, 1996; KULESHOVA *et al.*, 1999) e o Ficoll (KASAI *et al.*, 1990). Apesar de vários trabalhos demonstrarem a superioridade da trealose ao preservar a membrana lipídica e permitir uma melhor estabilização no momento do resfriamento e aquecimento, a sacarose é a de maior utilização (SAHA *et al.*, 1996; ARAV e ZERON, 1997; KULESHOVA *et al.*, 1999; ERGOLU *et al.*, 2005; TANG *et al.*, 2007).

Os sacarídeos são igualmente importantes durante o processo de aquecimento, funcionando como tampões osmóticos, equilibrando as altas concentrações dos crioprotetores intracelulares e reduzindo as diferenças de osmolaridade entre os compartimentos intra e extracelulares. A sacarose é utilizada neste tipo de procedimento, pois não apresenta efeitos tóxicos sobre as células embrionárias, mesmo quando empregada em altas concentrações (KASAI *et al.*, 1992; KULESHOVA *et al.*, 1999).

2.1.1.3. Associações de crioprotetores

Ao analisar as características próprias de cada crioprotetor intracelular percebe-se que, independente da capacidade individual de induzir a formação de estado vítreo, todos apresentam níveis de toxicidade. As associações de crioprotetores possuem a vantagem de reduzir a concentração de cada crioprotetor na solução, diminuindo a toxicidade (KASAI *et al.*, 1990; MASSIP, 2001; VAJTA e NAGY, 2006).

Um dos fatores da eficiência da vitrificação é a formulação de soluções de vitrificação que contêm pelo menos dois crioprotetores intracelulares (DMSO, EG, PROH, GLY e amidas), e um crioprotetor extracelular (sacarídeos, proteínas ou polímeros) (PALASZ e MAPLETOFT, 1996).

Rall e Fahy (1985) descreveram a primeira solução crioprotetora para a vitrificação de embriões de camundongo utilizando a associação de três crioprotetores intracelulares (DMSO, acetamida e PROH), acompanhados de uma macromolécula (polietileno-glicol), e obtiveram taxas de sobrevivência de 87,8% (301/343). Esta observação permitiu, posteriormente, a redução do potencial tóxico dos crioprotetores, em especial do DMSO, o que foi comprovado na presença das amidas (FAHY *et al.*, 1990).

Dentro das diferentes combinações de crioprotetores nas soluções de vitrificação de embriões murinos, Ishimore *et al.* (1992) vitrificaram mórulas e blastocistos utilizando seis diferentes misturas de crioprotetores intracelulares: 1) GLY + EG; 2) GLY + PROH; 3) GLY + DMSO; 4) EG + PROH; 5) EG + DMSO e 6) PROH + DMSO. A concentração de cada crioprotetor nas soluções era de 25%. As taxas de sobrevivência das mórulas foram, respectivamente, para as soluções 1, 2, 3, 4, 5 e 6 de 51% (30/59), 16% (10/62), 78% (47/60), 44% (27/61), 79% (50/63) e 50% (30/60), e no caso dos blastocistos, as taxas de sobrevivência foram de 72% (61/85), 29% (25/85), 55% (47/85), 46% (39/84), 79% (70/89) e 46% (41/89) para os seis grupos respectivamente. Pode-se observar que tanto na vitrificação de mórulas como na de blastocistos, as taxas de sobrevivência foram significativamente maiores nos grupos que usavam GLY + DMSO (3) e EG + DMSO (5). Levando-se em consideração os resultados acima, dentre todas as possibilidades de combinação a mais frequentemente utilizada é a solução composta por EG, DMSO e sacarose para as diferentes espécies como os camundongos (GRAVES-HERRING e BOONE, 2008), coelhos (VICENTE e GARCIA-XIMENEZ, 1994), suínos (CUELLO *et al.*, 2008) e bovinos (VIEIRA *et al.*, 2008).



#### 2.1.1.4. Procedimentos de adição e retirada dos crioprotetores:

O procedimento de exposição dos embriões às soluções crioprotetoras pode determinar uma maior ou menor taxa de sobrevivência à vitrificação (KASAI *et al.*, 1990; PALASZ e MAPLETOFT, 1996, VAJTA, 2000). O tempo e a temperatura de exposição são as principais variáveis, determinando os efeitos osmóticos e tóxicos sobre as células embrionárias (MAZUR e SCHNEIDER, 1986; ARAV, 1992).

Leibo (1984) realizando experimentos de congelação de embriões bovinos, propôs a exposição em etapas dos embriões à concentração final da solução crioprotetora. Este procedimento diminuiu o estresse osmótico e permitiu às células embrionárias uma melhor resposta às trocas hídricas que ocorrem através da membrana celular. O princípio também é válido após o aquecimento, no momento da retirada da solução crioprotetora das células embrionárias (VAJTA e NAGY, 2006; EL-GAYAR *et al.*, 2008). A restrição da quantidade e da velocidade com que os líquidos atravessam a membrana celular vai permitir que ocorra uma rehidratação praticamente inócua, preservando a viabilidade das células embrionárias.

As técnicas de vitrificação incorporaram estes procedimentos de adição e retirada em etapas dos crioprotetores, na procura de alcançar maior eficiência na sobrevivência dos embriões (LIEBERMANN *et al.*, 2003). Vale a pena ressaltar que a exposição dos embriões às denominadas soluções de equilíbrio, que são aquelas onde os crioprotetores estão presentes em baixas concentrações e que conferem a proteção às estruturas celulares, usualmente não trazem prejuízos a integridade dos embriões (SHAW e JONES, 2003; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Outra etapa importante é a exposição dos embriões à solução de vitrificação, que contém os crioprotetores em altas concentrações e que possui efeitos tóxicos importantes sobre a viabilidade embrionária (PALASZ e MAPLETOFT, 1996). De uma maneira geral os embriões são expostos à solução de vitrificação por períodos curtos de tempo e em temperaturas que podem variar de acordo com o procedimento preconizado (KASAI *et al.*, 1992).

Soluções que contêm substâncias não permeáveis à membrana celular são usualmente empregadas na remoção dos crioprotetores, como por exemplo, a sacarose ou trealose, que reduzem o estresse osmótico e tóxico das células embrionárias ao permitirem um menor fluxo de água através das membranas celulares (KASAI e MUKAIDA, 2004).

O procedimento de diluição em meio suplementado com sacarose é frequentemente utilizado após o aquecimento de embriões vitrificados (VIEIRA *et al.*, 2008; GRAVES-HERRING e BOONE, 2008; MORATÓ *et al.*, 2008). Por outro lado, recentemente foi demonstrado que os danos osmóticos das membranas das células embrionárias, provocados por soluções sem a presença de sacarose é mínimo (EL-GAYAR *et al.*, 2008).

#### 2.1.2. Recipientes para o envase dos embriões:

Rall e Fahy (1985) realizaram os primeiros experimentos de vitrificação de embriões mamíferos empregando palhetas de 0,25 mL ou criotubos para o acondicionamento. Os autores obtiveram altas velocidades de resfriamento ( $2.550^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) ao mergulhar as palhetas diretamente no nitrogênio líquido. Considerando estas observações iniciais, diferentes procedimentos foram descritos para vitrificar embriões mamíferos (VAJTA, 2000; KASAI, 2002; YAVIN e ARAV, 2007). No entanto, esses envases devido à utilização de amostras em volumes maiores que 150  $\mu\text{L}$  limitam o aumento das velocidades de resfriamento (PALASZ e MAPLETOFT, 1996).

Landa e Tepla (1990) vitrificaram embriões murinos utilizando microvolume, sem envasar, provocando contato direto da amostra com o nitrogênio. O procedimento possibilitou uma redução na concentração dos crioprotetores, ao mesmo tempo em que a velocidade de resfriamento foi acelerada. A difícil manipulação, identificação, segurança sanitária e a necessidade de usar amostras maiores de 5  $\mu\text{l}$ , fizeram com que o procedimento não se tornasse uma opção viável (VAJTA e NAGY, 2006).

Outras técnicas como o tamanho mínimo da gota (MDS) (ARAV, 1992) e as grades de microscopia eletrônica (electron microscope grids- EM) (MARTINO *et al.*, 1996),

proporcionando novas ferramentas permitiram a utilização de volumes menores que 10  $\mu\text{L}$  que ao mesmo tempo aceleraram as velocidades de resfriamento ( $\approx 3000^\circ\text{C}/\text{min}$ ). A partir do domínio desses procedimentos, a pesquisa se dirigiu na procura de envases que permitissem uma melhor manipulação e armazenamento.

Vajta *et al.*, (1998) descreveram o procedimento da palheta aberta esticada (open pulled straws - OPS). As OPS foram baseadas na idéia de diminuir o diâmetro das palhetas tradicionais, minimizando ainda mais o volume das amostras ( $< 5\mu\text{L}$ ) e a concentração requerida de crioprotetores, aumentando assim as taxas de resfriamento ( $> 20000^\circ\text{C}/\text{min}$ ). Sua utilização na vitrificação de blastocistos bovinos confirmou a superioridade deste envase ao obter taxas de sobrevivência de 94% (104/111) das OPS quando comparadas com o 70% (48/69) das palhetas convencionais.

Diferentes experimentos demonstraram que microrganismos sobrevivem por longos períodos de tempo, quando expostos ao nitrogênio líquido (RUBIN *et al.*, 2005 e BIELANSKY *et al.*, 2000). Bielansky *et al.* (2000) e Bielansky *et al.* (2003) quantificaram o potencial da transmissão de vírus em amostras de embriões vitrificados em envases abertos e fechados. Determinaram um percentual de 21% de contaminação das amostras nos envases abertos e 0% nos sistemas fechados.

Lane *et al.*, (1999) descreveram um sistema fechado denominado Cryoloop, que consiste em uma alça de fibra sintética (nylon curvado de 20  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,5–0,7 mm de largura), adaptado a um tubo de aço o qual é inserido na tampa de um criotubo. A partir deste novo envase foram vitrificados com sucesso embriões de camundongo e humanos. Os embriões de camundongo alcançaram uma taxa de eclosão de 95,5% (153/160), não sendo diferente da taxa observada com os embriões do grupo controle 87,5% (140/160). Na avaliação da sobrevivência *in vivo*, as taxas de implantação foram de 85% (51/60) com os embriões crioprotetores em cryoloop e 78,1% (46/60) com os do grupo controle. O percentual de fetos foi de 58,3% (35/60) e 55% (33/60), respectivamente. A vitrificação de embriões humanos proporcionou taxas superiores de eclosão 73,3% (13/18) e implantação 60% (11/18) quando comparado aos resultados do

grupo controle de 63,6% (8/12) e 36% (5/12), respectivamente. As vantagens da técnica são a utilização de mínimos volumes, manipulação, identificação e armazenamento da amostra.

Diferentes tipos de envase, associados a sistemas de armazenamento foram descritos com os objetivos de primeiro atingir maiores velocidades de resfriamento e segundo evitar contaminações provenientes do N<sub>2</sub>L, como por exemplo, o sistema da meia palheta (hemi-straw system) (VANDERZWALMEN *et al.*, 2000), a palheta esticada fechada (closed-pulled straw- CPS) (CHEN *et al.*, 2001), a nylon mesh (MATSUMOTO *et al.*, 2001) e a palheta esticada selada (sealed open-pulled straws) (LÓPEZ-BÉJAR e LÓPEZ-GATIUS, 2002).

Chen *et al.*, (2001) compararam a eficiência da CPS, através da sobrevivência de oócitos murinos vitrificados, com as palhetas de inseminação (0,25mL), com as OPS, com as CPS e nas grids. As taxas de sobrevivência dos ovócitos, verificada pelo desenvolvimento pós-fecundação até o estágio de blastocisto foram de 79% (215/273) nas CPS, 77% (198/257) nas palhetas de inseminação 63% (171/271) nas OPS e 39% (141/362) nas grids.

Por sua vez outros autores continuaram na procura de envases de volume mínimo baseados na redução dos diâmetros. Entre estes procedimentos se encontram os envases de ponteiros de gel (gel loading tips) (TOMINAGA e HAMADA, 2001), a sterile stripper tip (KULESHOVA e LOPATTA, 2002), a flexipet denuding pipette (FDP) (LIEBERMANN *et al.*, 2002), as palhetas super finas esticadas (super-finely pulled straw) (ISACHENKO *et al.*, 2003), a fine diameter plastic micropipette (CREMADES *et al.*, 2004), a ponteira de pipeta de 100µl (100 µl pipetting tip) (HREDZAK *et al.*, 2005), o cryotip e “cryotop” (KUWAYAMA *et al.*, 2005, MORATÓ *et al.*, 2008), e a malha metálica (metal mesh) (FUJINO *et al.*, 2008), melhorando a manipulação e o armazenamento das amostras, diminuindo as concentrações tóxicas dos crioprotetores e chegando a taxas de resfriamento estimadas de quase 180.000°C/min (FUJINO *et al.*, 2008) .

Kuwayama *et al.* (2005) desenvolveram dois sistemas que denominaram “cryotip” e

“cryotop”, sendo os mais amplamente utilizados na vitrificação de embriões humanos. O cryocip consiste em uma palheta com uma parte fina, conectado a uma base maior adaptada a um protetor de metal removível e o cryotop consiste em uma tira de polipropileno adaptada a uma palheta. Os embriões vitrificados com cryotips foram expostos a solução crioprotetora (1  $\mu$ L) e envasados em palhetas para posteriormente serem lacradas nos dois extremos por calor e mergulhada em nitrogênio líquido. Os envasados no cryotop foram colocados em volumes menores que 0,1  $\mu$ L da solução e mergulhado em nitrogênio líquido. As taxas de sobrevivência dos embriões vitrificados nos dois sistemas não apresentaram diferenças, proporcionando o cryotop 90% (5695/6328) e cryotip 93% (82/88). As taxas de gestação foram de 53% (2516/4745) e 51% (42/82) e as de parto de 45% (2138/4745) e 48% (39/82), respectivamente.

A utilização de novos materiais é outra das modificações realizadas nos procedimentos de envase, que permite o incremento das taxas de resfriamento, ao aumentar a troca térmica entre a amostra e o nitrogênio líquido. Materiais com maior capacidade de condutividade que o plástico, menor diâmetro interno e paredes mais finas, como as micropipetas de vidro (GMP) (MEZZALIRA *et al.*, 1999), apresentaram melhores taxas de vitrificação, quando comparadas com as OPS (KONG *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2002). Assim como, o uso das palhetas metálicas (BUNN *et al.*, 2006), ou os microcapilares de quartzo (QMC) que permitem curvas de resfriamento com velocidades superiores a 100.000°C/min (HE *et al.*, 2008).

Kong *et al.* (2000), fizeram uma comparação entre as GMP e as OPS para determinar a eficiência entre os dois envases. Por meio da vitrificação de blastocistos murinos, avaliaram as taxas de sobrevivência dos embriões vitrificados nas OPS ou nas GMP, obtendo resultados semelhantes com os dois envases. A taxa de re-expansão dos embriões vitrificados nas OPS foi de 93,5% (58/62), similar aos 95% (57/60) observados com as GMP. As taxas de eclosão foram de 88,7% (55/62) e 90,0% (54/60), respectivamente.

### 2.1.3. Nitrogênio superresfriado

A redução da temperatura do nitrogênio líquido é uma das estratégias que visam aumentar as taxas de resfriamento. A eliminação dos vapores de nitrogênio, que se formam no contato das amostras com a superfície do gás liquefeito, confere uma maior eficiência na transferência de calor entre as amostras e o nitrogênio líquido (VIEIRA *et al.*, 2008). Dessa forma um aumento na velocidade de resfriamento proporcionará, de acordo ARAV *et al.* (2002), uma redução na probabilidade de ocorrência da desvitrificação e recristalização durante o aquecimento.

Martino *et al.* (1996) vitrificaram oócitos bovinos colocados sobre microgrades de microscopia eletrônica, que foram imersas em nitrogênio líquido superresfriado com o auxílio de vácuo. Uma bomba de vácuo foi conectada a um dissecador, que continha o nitrogênio líquido, o que permitiu o aumento das taxas de resfriamento.

Dinnyes *et al.*, (2000) utilizaram um procedimento para a eliminação dos vapores de nitrogênio durante o processo de vitrificação. A vitrificação em superfície sólida (solid surface vitrification), que permite que os embriões contidos em uma microgota, sejam depositados em uma superfície sólida metálica, mantida a  $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Porém, as dificuldades desta técnica são a manipulação, identificação, armazenamento e controle sanitário dos embriões.

Estes princípios físicos foram aperfeiçoados e utilizados por Arav *et al.* (2000) para desenvolver o Vitmaster®. Este aparelho igualmente baseado na redução da temperatura do nitrogênio líquido até  $-210\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com o auxílio do vácuo, evita a ebulição do nitrogênio líquido, impedindo a sublimação do gás ao redor da amostra, acelerando as velocidades de resfriamento.

Santos *et al.* (2006), testaram uma alternativa técnica, que denominaram Nitrocooler®. O equipamento para a produção de  $\text{SN}_2$  ( $-210\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), consiste de um sistema de vácuo produzido por um compressor de geladeira acoplado a um recipiente vedado. O

objetivo dos autores foi determinar as taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário, utilizando nitrogênio superresfriado ou nitrogênio líquido, na vitrificação de oócitos bovinos. As taxas de desenvolvimento dos oócitos vitrificados através da imersão em  $\text{SN}_2$  foram maiores 9,7% (33/346), que as observadas com os oócitos submetidos ao nitrogênio líquido 5,4% (19/345), demonstrando a vantagem da diminuição dos vapores de nitrogênio. Em experimentos posteriores realizados pela equipe (WERLICH *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2008), os resultados do primeiro experimento não puderam ser alcançados, apresentando o nitrogênio superresfriado eficiência semelhante ao nitrogênio líquido.

### 3. Artigos:

#### 3.1. MOUSE BLASTOCYSTS VITRIFICATION USING DIMETHYLFORMAMIDE ASSOCIATED WITH ETHYLENE GLICOL OR 1-2 PROPANEDIOL AS CRYOPROTECTANT SOLUTION

Paula Rodriguez Villamil, Felipe Ledur Ongaratto, Daniela Scherer da Silva, Berenice de  
Ávila Rodrigues and José Luiz Rodrigues.

Master's Dissertation

Author: Paula Rodriguez Villamil

Adviser: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

#### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of dimethylformamide (DMF) associated with ethylene glycol (EG) or 1-2 propanediol (PROH) during vitrification, on the development of mouse blastocysts. Cryoprotectant toxicity was determined exposing the embryos for 1, 3 and 10 min to three different equilibration solutions composed with PVA 0.5% (v/v) and either DMF, EG or PROH mixtures (10% v/v of each). After 72 hours of *in vitro* culture, the survival rates were similar for the three solutions during interval times of 1 or 3 min, except for blastocysts exposed for 10 min to EG-PROH, which displayed higher survival rates ( $P < 0.05$ ). Blastocyst vitrification was performed bringing the embryos to three equilibration solutions and then to vitrification solutions composed by mixtures of DMF, EG or PROH (20% v/v each), using glass micropipettes (GMP). Fresh and vitrified blastocysts were cultured for 72 h, and survival rates were evaluated. Some expanded blastocysts were differentially stained using fluorochromes, Hoecht 33342 and propidium iodide to determine embryo cell number. The survival rate for the three vitrification solutions was different ( $P < 0.05$ ), with lower rates for blastocysts vitrified into solutions composed with DMF. Vitrified and fresh embryos had different mean number of cells ( $P < 0.05$ ) and cell proliferation rate was lower after vitrification. In conclusion, cryoprotectants solutions containing dimethylformamide have deleterious effects on the



developmental competence of vitrified mouse blastocysts; and highest survival rates were obtained with embryos put through cryoprotectant solution containing EG and PROH association.

**Keywords:** mouse, blastocyst, vitrification, dimethylformamide, glass micro pipettes.

## INTRODUCTION

Over the last 20 years, embryo cryopreservation processes have introduced abundant changes, aimed to improve survival rates and simplifying procedures. Vitrification is an inexpensive and simple method for cryopreservation of mammalian embryos. Rall and Fahy (1985) described vitrification as the physical process that solidifies a solution at low temperatures not by crystallization but by extreme viscosity increase during cooling.

According to Woods *et al.* (2004) to obtain this amorphous state, a higher concentration of cryoprotectant agents (4 to 8 M) than needed for traditional freezing (1 to 2 M) is required. These concentration levels would prevent ice crystal formation, by hydrogen-bonding with water molecules or by colligative interference; however this would probably cause cell damage due to osmotic and cytotoxic injuries (Kasai and Mukaida, 2004).

Many strategies have been developed to minimize these harmful effects, based on the use of lower toxicity cryoprotectants, and establishing optimal sample volume, concentration levels, temperature and interval of time of exposure (Liebberman *et al.*, 2003).

The use of cryoprotectants solutions with lower molecular weight is one of these strategies, allowing to minimize exposure time, reducing cryoprotectant concentration and preventing osmotic swelling (Shaw and Jones, 2003; Kasai and Mukaida, 2004). Among permeable cryoprotectants, EG (w= 62.02), DMF (w=73.1) and PROH (w=76.10) have lower molecular weight as compared with DMSO (w=78.13) and GLY (w=92.10) (Baudot *et al.*, 2000). The association of two or more of these agents should decrease individual specific toxicity. According to some researches, the mixture permeability is higher than that of its individual components (Vajta and Nagy, 2006). However, for the success of these

cryoprotectant association solutions, it is important to combine low and high molecular weight permeating cryoprotectants, in order to prevent ice crystal formation and also minimizing toxicity during freezing and thawing process (Palasz and Mapletoft, 1996).

The most common association for vitrification solutions contains EG and DMSO (Vajta and Nagy, 2006). Such components could be associated or replaced by other higher molecular weight cryoprotectants such as PROH and DMF, taking into account their similar glass forming with DMSO. PROH is one of the most stable glass forming agents (Boutron, 1984), being also less toxic and more permeable than DMSO. PROH has been previously used on mouse embryo and bovine oocyte vitrification and in association with other cryoprotectants (Ishimori *et al.*, 1992; Chian *et al.*, 2004). DMF is another cryoprotectant with a high glass-forming trend (Baudot and Boutron, 1998). DMF was previously successfully used in slow freezing of stallion semen (Squires *et al.*, 2004) and for vitrification of bovine oocytes (Siqueira-Pyles *et al.*, 2004) and fish embryos (Ding *et al.*, 2007). However, the effects of DMF on mouse embryo vitrification and its toxicity levels in association with other cryoprotectants are still unknown.

The aims of these experiments were to determine cryoprotectant toxicity and efficiency of DMF associated with EG or 1-2 propanediol PROH on *in vitro* viability of vitrified mouse blastocysts.

## **MATERIALS AND METHODS**

Except where otherwise indicated, all chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Culture media and solutions were prepared using water purified by Milli-Q synthesis system (Millipore, Bedford, MA, USA).

The study followed the guidelines for animal care and animal use introduced by Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

#### *Vitrification test of solutions*

This setup was used to determine threshold (minimum) cryoprotectant concentration required to completely avoid opacity during cooling of different cryoprotectants solutions. Vitrification test solutions were prepared using dimethylformamide (10%, 15%, 20% and 25% v/v), associated with 20% of EG or 20% of PROH diluted in PBS supplemented with 0,5% PVA. Each solution was tested for its ability to vitrify after loading into 0.25 ml transparent straws (IMV®, France) and glass micropipette (GMP), and then plunging into liquid nitrogen (LN<sub>2</sub>). Straws were then warmed in air at room temperature (22°C). Vitrification was assessed by direct ocular inspection (Kasai *et al.*, 1990; Seki and Mazur, 2008); solutions remaining transparent trough cooling and warming were considered to have vitrified completely, while those becoming milky were considered not vitrified.

#### *Production of Mouse Embryos*

*Mus dosmesticus domesticus*, swiss albino strain, fertile males aged between two and ten months and fertile females aged between six and eight weeks were used in the experiments. Animals were kept under controlled temperature (22±2°C) and light (14h light/10h dark cycle) conditions. Food and water were provided *ad libitum*. Females were superovulated by intraperitoneal 10 IU injection of equine chorionic gonadotropin (eCG - Folligon®, Intervet) followed 46 h later by intraperitoneal 10 IU injection of human chorionic gonadotropin (hCG - Chorulon®, Intervet), then donors were mated overnight with intact males. Early next morning, females with a vaginal plug were selected for embryo collection. Nighty-six hours after hCG injection, females were subjected to cervical dislocation and uterine horns were flushed individually with 0.5 mL PBSm medium. Only embryos at blastocyst and expanded blastocyst stages of excellent morphological quality were randomly allocated into experimental groups.

#### *Toxicity Test of Vitrification Solution*

Selected groups of embryos were exposed at 37°C for 1, 3 or 10 min in one of the following equilibration solutions: **ES1** (10% PROH + 10% DMF + 0.5% PVA + PBS), **ES2** (10% EG + 10% DMF + 0.5% PVA + PBS) or **ES3** (10% PROH + 10% EG + 0.5% PVA + PBS). After exposure, embryos were transferred to PBSm medium supplemented with 0.5

M sucrose, and after 5 min, embryos were washed in PBSm and placed into KSOM medium droplets (100  $\mu$ L) for *in vitro* culture. Embryos from control group were transferred to KSOM medium and *in vitro* cultured without any treatment immediately after collection. Re-expansion and hatching rates were evaluated after 72 h of *in vitro* culture.

#### *Vitrification and warming procedure*

The vitrification procedure was based on open pulled straw (OPS) technology originally described by (Vajta *et al.* 1998), with modifications. OPS plastic straws were substituted by glass micro pipettes (GMP). The GMPs were made from capillary tubes softened by heat, and pulled manually until its outer diameter reached approximately 0.6 mm. Embryos were distributed into three different vitrification experimental groups and a control group. Control group: embryos were transferred to KSOM medium drops for *in vitro* culture without any treatment immediately after collection. Group 1: embryos were exposed to **ES1** (10% PROH + 10% DMF + 0.5% PVA) for 1 min, followed by **VS1** (20% PROH + 20% DMF + 0.5% PVA) for 30 sec; Group 2: embryos were exposed to **ES2** (10% EG + 10% DMF + 0.5% PVA) for 1 min followed by **VS2** (20% EG + 20% DMF+ 0.5% PVA) for 30 sec; and Group 3: embryos were exposed to **ES3** (10% PROH + 10% EG + 0.5% PVA) for 1 min, followed by **VS3** (20% EG+ 20% PROH + 0.5% PVA) for 30 sec. After exposure at 37°C, embryo was loaded by capillarity, placing the narrowest end of capillary tubes into 2 $\mu$ L VS droplets, to be plunged into super-cooled nitrogen (LN<sub>2</sub>). Embryo warming and cryoprotectant dilution were carried out by plunging the narrowest end of the capillaries into 300  $\mu$ L droplets of PBSm supplemented with 0.25 M sucrose, and finally embryos were transferred to 100 $\mu$ L KSOM medium droplets for *in vitro* culture.

#### *Assessment of in vitro embryo development*

Control group non-vitrified (n=123) and vitrified embryos (n= 324) were *in vitro* cultured in 100  $\mu$ L droplets of KSOM medium supplemented with 0.4% of BSA, under oil, at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> and saturated humidity. The re-expansion and hatching rates were examined at 24 h intervals during 72 h.

*Differential ICM and TE cell counts*

Some expanded and hatched embryos were considered viable, and also were differentially stained for counting trophoctoderm (TE) and inner cell mass (ICM) nuclei. Blastocysts were differentially stained using ionic detergent, Triton-X 100 and fluorochromes, Hoechst 33342 and propidium iodide, as previously described (Thouas *et al.*, 2001). Stained blastocysts were mounted on a glass slide containing a drop of glycerol and gently flattened with a coverslip before being examined under fluorescence microscopy.

*Statistical analysis*

Re-expansion and hatching rates were compared by Chi-square test, for a significance level of ( $P < 0.05$ ). ICM and trophoctoderm mean cells numbers were compared by ANOVA ( $P < 0.05$ ).

## RESULTS

### *Vitrification test of solutions*

Results in Table 1 showed that 10% and 15% DMF concentrations were not able to induce vitrification in the solution containing EG or PROH. On the other hand, the cryoprotectant solutions containing 20% DMF associated with EG or PROH have solidified without crystallization.

**Table 1.** Occurrence of vitrification state for different solutions during cooling and warming

Test Solution		Procedure	
Cryoprotectant 1	Cryoprotectant 2	Vitrification	Warming
10% DMF	20% EG	-	-
	20%PROH	-	-
15% DMF	20% EG	-	-
	20%PROH	-	-
20%DMF	20% EG	+	+
	20%PROH	+	+
30%DMF	20% EG	+	+
	20%PROH	+	-

(-) Not vitrified, milky appearance; (+) Vitrified, transparent appearance.

*Toxicity Test of Vitrification Solution*

Embryo *in vitro* survival rates after exposure to different equilibrium solutions are shown in Table 2. No relevant differences were observed between blastocysts re-expansion or hatching rates, after 1 or 3 min exposure to different cryoprotectant solutions. However, 10 min exposure time to DMF containing cryoprotectant solutions led to a significant reduction in embryo re-expansion and hatching rates.

**Table 2.** Embryo re-expansion and hatching rates after exposure to equilibration solution at three different time intervals (5 replicates).

Solutions	Nº. of embryos re-expanded / Nº of embryos treated (%)			No. of embryos hatched / Nº of embryos treated (%)		
	Exposure time			Exposure time		
	1 min	3 min	10 min	1 min	3 min	10 min
<b>ES1</b>	49/51 <sup>a</sup> (96)	47/56 <sup>a</sup> (84)	0/49 <sup>d</sup> (0) <sup>d</sup>	36/51 <sup>b</sup> (70)	42/56 <sup>b</sup> (75)	0/49 <sup>c</sup> (0)
<b>ES2</b>	56/57 <sup>a</sup> (98)	57/57 <sup>a</sup> (100)	15/56 <sup>c</sup> (26) <sup>c</sup>	50/57 <sup>a</sup> (87)	46/57 <sup>b</sup> (80)	8/56 <sup>c</sup> (14)
<b>ES3</b>	53/53 <sup>a</sup> (100)	58/58 <sup>a</sup> (100)	56/58 <sup>b</sup> (96) <sup>b</sup>	43/53 <sup>a</sup> (81)	47/58 <sup>b</sup> (81)	44/58 <sup>b</sup> (76)
<b>Control</b>	47/52 <sup>a</sup> (92)					

**ES1**= 10% PROH + 10% DMF + 0.5% PVA, **ES2**= 10% EG + 10% DMF + 0.5% PVA, **ES3**=10% PROH + 10% EG + 0.5% PVA.

<sup>a,b,c</sup> Numbers in same column without common superscripts differ, P<0.01.

*Assessment of in vitro embryo development*

Embryo viability observed 72 h after thawing and *in vitro* culture are summarized in Table 3. Blastocysts vitrified after exposure to ES3/VS3 solutions showed similar survival rates to embryos in control group. On the other hand, DMF containing cryoprotectant solutions led to a significant reduction in embryo re-expansion and hatching rates, when compared to control group and to ES3/VS3 vitrified embryos.

**Table 3.** Embryo re-expansion and hatching rates after vitrification (5 replicates).

Treatments	Embryos	Re-expanded embryos	Hatched embryos
	N	N (%)	N (%)
<b>ES1+ VS1</b>	108	13 <sup>c</sup> (12)	3 <sup>d</sup> (3)
<b>ES2+VS2</b>	111	46 <sup>b</sup> (38)	19 <sup>c</sup> (17)
<b>ES3+VS3</b>	105	89 <sup>a</sup> (84)	73 <sup>b</sup> (70)
<b>Control</b>	123		113 <sup>a</sup> (92)

**ES1**= 10% PROH + 10% DMF + 0.5% PVA, **VS1**=20% PROH + 20% DMF + 0.5% PVA; **ES2**= 10% EG + 10% DMF + 0.5% PVA, **VS2**= 20% EG + 20% DMF + 0.5% PVA; **ES3**=10% PROH + 10% EG + 0.5% PVA, **VS2**= 10% EG + 10% DMF + 0.5% PVA.

<sup>a,b,c,d</sup> Numbers in same column without common superscripts differ, P<0.01.



*Differential ICM and TE cell counts*

Embryos in control group were significantly constituted by more cells (total, ICM and TE cells) when compared to the number of cells observed in vitrified embryos (Table 4). Hatched embryos after vitrification by exposure to ES1/VS1 solutions were not stained after re-warming and *in vitro* culture, due to low survival rates.

**Table 4.** Mean inner cell mass (ICM), trophoectoderm (TE) and total cell number in mouse blastocysts.

Treatment	N° Embryos	No. Cells		
		Total (Mean±SD)	TE (Mean±SD)	ICM (Mean±SD)
ES2+VS2	15	72.9 ± 4.3 <sup>b</sup>	51.5 ± 2.7 <sup>b</sup>	21.4 ± 23.0 <sup>b</sup>
ES3+VS3	18	73.9 ± 4.8 <sup>b</sup>	52.5 ± 3.9 <sup>b</sup>	21.4 ± 2.6 <sup>b</sup>
Control	31	87.4 ± 7.49 <sup>a</sup>	63.7 ± 5.3 <sup>a</sup>	23.7 ± 3.1 <sup>a</sup>

ES1= 10% PROH + 10% DMF + 0.5% PVA, VS1=20% PROH + 20% DMF + 0.5% PVA; ES2= 10% EG + 10% DMF + 0.5% PVA, VS2= 20% EG + 20% DMF + 0.5% PVA; ES3=10% PROH + 10% EG + 0.5% PVA, VS3= 10% EG + 10% DMF + 0.5% PVA.

<sup>a,b</sup> Numbers in same column without common superscripts differ (ANOVA), P<0.05.

## DISCUSSION

Since the first successful embryo vitrification (Rall and Fahy, 1985), the description of cryoprotectant associations, nontoxic and stable enough to avoid ice formation and preserve embryo viability, has been challenging. In order to find a suitable association, our study tested DMF associated with EG or PROH to vitrify mouse blastocysts. First we examined the DMF glass-forming ability in association with EG or PROH. The vitrification tendency of cryoprotectant solutions were evaluated through visual inspection, as previously reported (Kasai *et al.*, 1990; Titterington *et al.*, 1995; Mukaida *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2008; Seki and Mazur, 2008). Our results (Table 1) showed that a DMF presence of 20% in vitrification

solutions was sufficient to achieve vitreous state. Higher DMF concentrations such as 30% in association with PROH (20% v/v), were unstable and crystallized during the warming process, probably due to elevated glass forming tendencies of these two cryoprotectants (Baudot *et al.*, 2000). This result was not similar for DMF (30% v/v) and EG (20% v/v) association due to the fact that EG is weak glass-forming, and showed lower presence of hydrate forms. Taking into account these observations, in order to avoid toxicity and osmotic stress, but ensuring adequate vitrification on the medium, we decided to use the minimal cryoprotectant concentration required for satisfactory vitrifying after exposure to LN<sub>2</sub>.

Cryoprotectant toxicity is another important factor for successful vitrification. It is difficult to predict responses of individual cryoprotectant agents or mixtures, depending on multiple variables as concentration, exposure time, temperature, and embryo traits such as developmental stage and membrane permeability (Fahy *et al.*, 2004; Bertolini *et al.*, 2005).

Furthermore, we examined embryo survival rates after exposure at three different time intervals (1, 3 or 10 min) to the equilibration solutions. Results from 1 and 3 min exposure times reflected no significant differences in embryo re-expansion and hatching rates between experimental groups, showing that these exposure times were harmless to embryo development ability. However, embryos exposed for 10 min to DMF containing cryoprotectant solutions showed significantly lower survival rates. These findings indicated that DMF specific toxicity is higher than that of other cryoprotectants. Nevertheless, this could be controlled, as previously described, by reducing embryo exposure time (Kasai and Mukaida, 2004; Lieberman *et al.*, 2003). Therefore, the EG presence in cryoprotectant solutions showed lower toxicity effects on *in vitro* embryo development ability, with higher survival rates observed with PROH (Emiliani *et al.*, 2000; Massip, 2001; Chian *et al.*, 2004).

*In vitro* embryo survival rates after vitrification showed that the cryoprotectant solutions ES3/VS3 were most suitable to preserve embryo development ability (Table 3). The observed re-expansion rate (84%) of ES3/EV3 differed from that showed by embryos exposed to ES1/VS1 (12%) and ES2/VS2 (38%) solutions. When we focused on embryo

hatching rates, regardless rate of embryos exposed to ES3/VS3 solution (70%) differed from control group (92%), the result was significantly higher than observed after using ES1/VS1 (3%) or ES2/VS2 (17%) solutions. These data demonstrated EG efficiency associated with PROH as cryoprotectant solution for blastocysts vitrification, and confirmed previously reported observations (Ishimori *et al.*, 1992; Lange, 2008; Nivia, 2008). Nevertheless, hatching rate of vitrified blastocysts in our experiment, 70% (73/105), was higher than reported by Ishimori *et al.* (1992) (46%), Lange (2008) (42,9%) and Nivia (2008), that used 1 min (37%) or 3 min (60%) exposure to equilibrium solution.

Furthermore, cryoprotectant solutions containing DMF (ES1/VS1 and ES2/VS2) were not appropriate to vitrify mouse blastocysts, since embryo *in vitro* hatching rates were 3% (3/108) and 17% (19/111), respectively. The most probable reason for this viability decrease could be due not only to the toxicity of such cryoprotectant, but possible solution crystallization during warming procedure. These crystallization process was clear on solutions with 30% DMF in association with 20% PROH during thawing process. However, transparent appearance for 20% DMF solutions does not exempt from crystallization, since visual inspection does not detect devitrified samples when crystals are smaller than wavelength for visible light rays; they may be present, but not visible (Jin *et al.*, 2008).

The DMF had a higher glass-forming tendency than glycerol and ethylene glycol, due to higher water bonding compounds (Baudot and Boutron, 1998). According with Sukhno *et al.* (2008), the common association of DMF with water is a stable combination containing two or three molecules of water  $\text{DMF}-(\text{H}_2\text{O})_2$  or  $\text{DMF}-(\text{H}_2\text{O})_3$ , increasing the incidence of hydrates forms. The stoichiometry studies demonstrated that water-DMF system is quite similar to the water-DMSO system, showing that DMF could be a efficient glass former, despite hydrates forms observed in DMF solutions showing thermograms more complicated than DMSO. Due to hydrates formation, two melting points could appear during warming process; one at temperatures of  $-49.5^\circ\text{C}$  and the second at  $-47,7^\circ\text{C}$ , represented a crystallization peak of solution, and probably a devitrification due to the presence of ice forms (Baudot and Boutron, 1998). However, It may be possible to

circumvent these two melting peaks of ice and hydrate forms, using higher warming rates (>20.000°C/min). According to Seki and Mazur (2008) the rapid warming would minimize both the formation of intracellular ice crystals by devitrification and their growth to lethal size by crystallization.

Harmful effects of vitrification solutions or vitrification procedure *per se* may impair development kinetics, causing viable embryos to delay development (Bertolini *et al.*, 2005). Taking into account this information, we have differentially stained embryos to obtain more accurate information about embryo quality and embryo cell differentiation. Results showed that vitrified embryos, disregarding cryoprotectant solution, had lower ICM and TE cells counts than embryos in control group. Cell membranes suffering cryoinjuries during cooling and warming procedures (Mazur, 1970) are probably the cause for cell number in embryos after vitrification, which could impair further embryo development (Kaidi *et al.*, 2001).

## CONCLUSION

Cryoprotectants solutions containing dimethylformamide have deleterious effects on developmental competence of vitrified mouse blastocysts, with highest expansion and hatching rates obtained when cryoprotectant solution included EG and PROH.

## REFERENCES

- Baudot, A.; Boutron, P. Glass-Forming Tendency and Stability of Aqueous Solutions of Diethylformamide and Dimethylformamide. **Cryobiology**, v.37, p.187-199, 1998.
- Baudot, A.; Alger, L.; Boutron, P. Glass-Forming Tendency in the System Water–Dimethyl Sulfoxide. **Cryobiology**. v. 40, p. 151-158, 2000.
- Bertolini, M.; Lange, M.C.; Rodrigues, J.L. *In vitro* and *in vivo* survival of mouse morulas and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, 245-251, 2005.
- Boutron, P. More accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions: Comparison with equilibrium. **Cryobiology**.v. 21, p. 183–191, 1984.

- Chian, R. *et al.* High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. **J Reprod. Dev.** v. 50, 685-696, 2004.
- Ding, F.H.; Xiao, Z.; Li, J. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream *Pagrus major* embryos. **Theriogenology**, v. 68, 702–708, 2007.
- Emiliani, S. *et al.* Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. **Human Reproduction**, v. 15, 905-910, 2000.
- Fahy, R. *et al.* Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**. v. 48, p.22–35, 2004.
- Ishimori, H.; Takahashi, Y. and Kanagawa, H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. **Theriogenology**, v.37, 481-487, 1992.
- Jin, B. *et al.* Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. **Cryobiology**, v.56, 233-240, 2008.
- Kaidi, S. *et al.* Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 65, 1127–1134, 2001.
- Kasai, M. *et al.* A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 91 – 97, 1990.
- Kasai, M.; Mukaida, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive Biomedicine online**. v. 9, p. 164-170, 2004.
- Lange, M. C. **Vitrificação de diferentes estádios embrionários de *Mus domesticus domesticus* envasados em microvolume e expostos ao nitrogênio líquido a  $-200^{\circ}\text{C}$ .** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2008.
- Liebermann, J.; Dietl, J.; Vanderzwalmen, P.; Tucker, M. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? **Reproductive Biomedicine Online**, v. 7, 623-633, 2003.
- Massip, A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. **Reprod Dom Anim**, v.36, 49-55, 2001.
- Mazur, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v.168, 939-949. 1970.
- Mukaida, T. *et al.* Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. **Hum Reprod**. v.13, 2874-2879, 1998.

- Nivia, A. **Sobrevivência *in vitro* de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em macro ou microvolume de crioprotetor.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2008.
- Palasz, A. T.; Mapletoft, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 14, 127-149, 1996.
- Rall, W. F.; Fahy, G.M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, v. 313, 573-575, 1985.
- Seki, S.; Mazur, P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. **Biol Reprod.** v. 79, 727-737, 2008.
- Shaw, J. M.; Jones, G. M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. **Human Reproduction update**, v. 9, 583-605, 2003.
- Siqueira-Pyles, E. S. C.; Fernandes, C. B.; Landim-Alvarenga, F.C. Use of etilene-glycol, dimethylsulfoxid and dimethylformamide in the vitrification of bovine embryos in open pulled straws. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, 162, 2004.
- Squires, E. L.; Keith, S. L.; Graham, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, 1056-1065, 2004.
- Sukhno, I. V.; Buzko, V. Y.; Panyushkin, V. T. The Physicochemical characteristics of heteroassociates in the N,N-Dimethylformamide-Water System. **Russian Journal of Physical Chemistry**. v. 82, 717-722, 2008.
- Thouas, G. A. *et al.* Simplified technique for differential staining of inner cell mass and tropectoderm cells of mouse and bovine blastocyst. **Reproductive BioMedicine Online** v.3(1), 25-29, 2001.
- Titterington, J. L.; Robinson, J.; Killick, S. R.; Hay, D. M. Synthetic and biological macromolecules: protection of mouse embryos during cryopreservation by vitrification. **Hum Reprod.** v. 10, p. 649-653, 1995.
- Vajta, G. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev** v.5; 53-58, 1998.
- Vajta, G.; Nagy, Z. P. Are programable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, 779-796, 2006.
- Woods, E. J.; Benson, J. D.; Agca, Y.; Critser, J. K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**. v. 48, 146-156, 2004.

### **3.2. SURVIVAL OF VITRIFIED MOUSE BLASTOCYSTS LOADED INTO GLASS MICRO-CAPILLARIES**

Paula Rodriguez Villamil, Felipe Ledur Ongaratto, Daniela Scherer da Silva, Berenice de Ávila Rodrigues and José Luiz Rodrigues.

Master's Dissertation

Author: Paula Rodriguez Villamil

Adviser: José Luiz Rodrigues

#### **ABSTRACT**

The purpose of this study was to determine the *in vitro* expansion and hatching rates of vitrified mouse blastocysts loaded into glass micro-capillaries (Brand® - 5 µL). Early morning on day 4 of pregnancy, blastocysts were collected from donors, morphologically evaluated, and then allocated in three groups: Group 1 (Control): embryos were transferred into 100 µL of KSOM medium drops and *in vitro* cultured during 72 h; Groups 2 and 3: embryos initially exposed to the equilibration solution (PBSm + 10% EG + 10% PROH and 0.5% PVA) for 1 min, and then to vitrification solution (PBSm + 20% EG + 20% PROH + 0.5% PVA) for 30 sec. After that, blastocysts were loaded into glass micropipettes (GMP) or glass microcapillaries (GMC) and plunged into super-cooled liquid nitrogen (-200°C). Embryo warming and cryoprotectant dilution were carried out by plunging the narrowest end of the capillaries into 500 µL droplets of PBSm supplemented with 0.25 M sucrose maintained at 37°C. After 5 min embryos were transferred to 100 µL droplets of KSOM medium and cultured *in vitro* for 72 h. Blastocyst expansion rates after *in vitro* culture were 77% (138/177) and 74% (131/175), for blastocysts vitrified in GMP and GMC, respectively. Blastocyst hatching rate (control group) was 91% (134/146), which was higher than for embryos loaded in GMP 61% (108/177) and GMC 53% (93/175). ICM number in control group embryos contained  $25.7 \pm 2.5$  cells and did not differ from the mean cell number observed in vitrified embryos loaded in GMP ( $24.2 \pm 2.3$ ) or GMC ( $22.5 \pm 2.59$ ). Regarding the trophoectoderm cell number, Group 1 embryos displayed

63.1±3.0 cells, and also not differ from the cell numbers of the embryos loaded into GMP (58.0±1.8) or GMC (58.0±3.7). In conclusion, manufactured GMC (Brand®) tested in this study showed same efficiency as GMP for vitrification of mouse blastocysts.

Keywords: Mouse, blastocyst, vitrification, glass micropipettes, micro capillaries.

## INTRODUCTION

The first container successfully used for vitrification of mouse oocytes and embryos was the French insemination straw (Rall and Fahy, 1985), which uses large volume samples (>20 µL) and achieves ≈2500°C/min cooling and warming rates (Palasz and Mapletoft, 1996).

According to He et al. (2008) containers have been significantly improved since then, leading to the development of more efficient devices. Almost all devices attempt to use minimum volumes to provide low or non-toxic cryoprotectants concentration and higher cooling rates in order to minimize cell injury and toxicity damage caused by vitrification process. these devices include minimum drop size (MDS) (Arav, 1992), electron microscopic grids (Martino et al., 1996; Arav and Zeron, 1997), cryoloops (Lane et al., 1999), hemi-straw system (Vanderzwalmen et al., 2000), gel loading tips (Tominaga and Hanada, 2001), nylon mesh (Matsumoto et al., 2001), fine diameter plastic micropipette (Cremades et al., 2004), and 100 uL pipetting tip (Hredzák et al., 2005). The most commonly used is the open pulled straw (OPS) method, which raised cooling and warming rates (over 20,000 °C/min), decreasing toxic and osmotic cell damage (Vajta, 1997).

However, plastic materials have lower heat conductivity (0.2 WmK), what limits cooling rates. Using other materials with higher heat conductivity such as glass (0.8 WmK), could enhance heat transfer and achieve faster cooling rates, to attain more than 20.000°C/min (He et al., 2008). Kong et al. (2000) demonstrated that glass micropipettes (GMP) allowed higher cooling and warming rates when compared to OPS, due to higher heat conductivity of glass and lower volume of cryoprotectant solution containing embryos. Also, GMP size



can be reduced more than OPS (i.d 0.3 mm vs 0.8 mm), avoiding embryo damage and increasing viability rates (Kong et al., 2000; Cho et al., 2002).

Nevertheless, GMPs are handmade containers, and do not allow to control loaded volumes and standard parameters among pipettes. Glass microcapillaries (GMC) of 5  $\mu$ L produced by Brand® provide standard volumes (2  $\mu$ L), avoiding handmade GMP; and a convenient manipulation either during stepwise procedure or under liquid nitrogen, indicated that it can be considered as tool for murine embryo vitrification. The aim of this study was to determine in vitro survival of mouse blastocysts loaded into standard micro-capillaries (Brand®, Germany) and plunged directly into super-cooled LN<sub>2</sub>.

## **MATERIALS AND METHODS**

Except where otherwise indicated, all chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Culture media and solutions were prepared using water purified by Milli-Q synthesis system (Millipore, Bedford, MA, USA).

This study followed the guidelines for animal care and animal use introduced by Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

### *Production of Mouse Embryos*

Fertile male mice, aged between two and ten months and fertile females aged between six and eight weeks of *Mus domesticus domesticus*, swiss albino strain, were used in the experiments. Animals were kept under controlled temperature ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and light (14h light/10h dark cycle) conditions. Food and water were provided *ad libitum*. Females were superovulated by intraperitoneal 10 IU injection of equine chorionic gonadotropin (eCG - Folligon®, Intervet) followed 46h later by intraperitoneal 10 IU injection of human chorionic gonadotropin (hCG - Chorulon®, Intervet). Afterwards, donors were mated overnight with males. Early next morning those females with a vaginal plug were selected for embryo collection. Ninety-six hours after hCG injection, females were subjected to cervical dislocation and uterine horns were flushed individually with 0.5 mL PBSm medium. Only embryos at blastocyst and expanded blastocyst stages of excellent morphological quality were randomly allocated into experimental groups.

#### *Preparation of GMP and GMC characteristics*

GMC (5  $\mu$ L) manufactured by Brand® (Germany), has 1.0 mm outer and 0.6 mm inner diameter. GMP were made according Vajta *et al.* (1998), using capillary tubes with outer/inner diameter of 1.5/1.0 mm, respectively (microhematocrit tubes, Perfecta®). They were softened by heat, and pulled manually until outer central part diameter decreased from 1.0 mm to approximately 0.6 mm. Then the hand pulled GMPs were cooled in air, broken at the narrowest point after being scribed with a diamond tip and sterilized by heat as described by Viera *et al.* (2008).

#### *Vitrification procedure*

Vitrification procedure was based on OPS technology originally described by Vajta *et al.* (1998), with modifications. Equilibration solution (VS<sub>1</sub>) was PBSm added with 10% EG + 10% PROH + 0.5% polyvinyl alcohol (PVA). Embryos were kept at 37°C into VS<sub>1</sub> for 1 min before being transferred and maintained during 30 s into vitrification solution (VS<sub>2</sub>) made of PBSm supplemented with 20% EG + 20% PROH + 0.5% PVA. Five embryos were loaded into each GMP or GMC by capillarity, placing the narrowest end of capillary tubes into 2 $\mu$ L VS droplets, which were immediately plunged into super-cooled nitrogen (LN<sub>2</sub>).

#### *Embryo warming and cryoprotectant dilution*

Embryo warming and cryoprotectant dilution were carried out by plunging the narrowest end of the capillaries into 300  $\mu$ L droplets of PBSm supplemented with 0.25 M sucrose at 37°C, and after 5 min embryos were transferred into 100 $\mu$ L KSOM medium droplets for *in vitro* culture.

#### *Assessment of in vitro development*

Control group (non-vitrified) and vitrified embryos were *in vitro* cultured into 100  $\mu$ L droplets of KSOM medium supplemented with 0.4% of BSA, under oil, at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> under saturated humidity. The re-expansion and hatching status of embryos were examined at 24 h intervals during 72 h.

### *Differential ICM and TE cell counts*

All embryos that re-expanded and hatched were considered viable and were differentially stained to count trophoctoderm (TE) and inner cell mass (ICM) nucleus. Blastocysts were differentially stained using ionic detergent, Triton-X 100 and fluorochromes, Hoechst 33342 and propidium iodide, as previously described (Thouas *et al.*, 2001). Stained blastocysts were mounted on a glass slide containing a 10uL drop of glycerol. Counts were performed on blastocysts which were gently flattened with a cover slip and examined under fluorescence microscopy.

### *Statistical analysis*

Re-expansion and hatching rates were compared by Chi-square test, for a significance level of ( $P < 0.05$ ). ICM and trophoctoderm mean cells numbers were compared by ANOVA ( $P < 0.05$ ).

## **RESULTS**

The embryo recovery rate after warming was 95.67% (177/185) of those loaded into GMP, and 94.5% (175/185) into GMC, showing that procedure efficiency was similar in both containers. Embryo viability after warming, observed at 24 and 72 h after *in vitro* culture is summarized in Table 2. After 24 h of *in vitro* culture, re-expanded mouse blastocysts rates did not differ whether loading embryos into GMP (77%) or GMC (74%). Table 2 shows same results on embryo viability after 72 h of *in vitro* culture. Hatching rates were similar among two experimental groups, 53% and 61%, achieved by embryos loaded into GMC and GMP, respectively.

Hatched blastocysts from control group showed significantly more cells when compared to vitrified, warmed and *in vitro* cultured hatched blastocysts (Table 3). However, embryos loaded into GMP showed similar ICM cell number when compared to control group. Cell numbers (total number, ICM and TE) did not differ among vitrified embryos loaded into GMP or GMC.

**Table 1.** Embryo re-expansion and hatching rates after vitrification in two different containers.

Treatment	Embryos	Re expanded embryos	Hatched embryos
	N°	N° (%)	N° (%)
Control	146	_____	134 (91) <sup>a</sup>
GMP	177	138 (77) <sup>a</sup>	108 (61) <sup>b</sup>
GMC	175	131 (74) <sup>a</sup>	93 (53) <sup>b</sup>

**GMP:** Glass micro-pipette; **GMC:** micro-capillary

<sup>a,b</sup> Numbers in same column without common superscripts differ, P<0.05

**Table 2.** Mean inner cell mass (ICM), trophoectoderm (TE) and total cell number in mouse blastocysts.

Treatment	Embryos N°	Cells N°		
		Total	TE	ICM
		(Mean±SD)	(Mean±SD)	(Mean±SD)
Control	21	88.80±3.30 <sup>a</sup>	63.13±3.00 <sup>a</sup>	25.68±2.50 <sup>a</sup>
GMP	18	82.20±3.73 <sup>b</sup>	58.05±1.80 <sup>b</sup>	24.15±2.30 <sup>ab</sup>
GMC	12	80.46±4.70 <sup>b</sup>	58.00±3.50 <sup>b</sup>	22.46±2.59 <sup>b</sup>

**GMP:** Glass micro-pipette; **MC:** micro-capillary

<sup>a,b</sup> Numbers in same column without common superscripts differ (ANOVA), P < 0.05.

## DISCUSSION

It is known that increasing cooling rates results in higher embryo survival (Vajta *et al.*, 1998, He *et al.*, 2008). The increase of cooling rates is an important parameter of vitrification process, because passage through critical low temperature is more rapid when compared with conventional vitrification methods (Vajta, 1997).

Cooling rate is directly influenced by temperature, thermal conductivity of containers, and related holding volume of medium surrounding the embryos (Bunn *et al.*, 2006; Sun *et al.*,

2008). Minimum vitrification volumes increment cooling and warming rates and decrease chances of crystal nucleation formation in small samples (Rall, 1987). Procedures like loading embryos into OPS could diminish vitrification solution volumes and lead to higher embryo survival rates. OPS allows to obtain faster cooling rates ( $>20,000^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) than French conventional straws ( $2,500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), decreasing cell chilling and toxicity. However, it has been shown in previously experiments that GMP improved embryo survival rates when compared to OPS (Kong *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2002). GMP and GMC also allow an increase cooling rate due to higher heat conductivity of glass and a smaller volume of frozen sample. These two vessels can be reduced more than OPS, for example the inner diameter of GMP can be reduced to 0.3 mm, GMC has 0,6 mm of inner diameter, compared to 0.8 mm of OPS straws, minimizing dimension and loaded volumes inside the container.

In this study, the results confirm these observations showing that the two glass capillary systems are efficient for vitrification of murine embryos. The post warming embryo recovery rates of 95.67% (177/185) observed with the GMP and 94.5% (175/185) obtained with GMC did not differ, showing easy embryo manipulation and similar efficiency as embryo containers. The *in vitro* survival rates after vitrification observed with embryos loaded into GMP or GMC did not differ. The re-expanded showed similar results using the GMP (77%) or the GMC (74%) to load the embryos, and the hatching rates (61% and 53%, respectively) were also similar among the embryos loaded into the two different containers.

However, differences between GMP and GMC survival rates are probably due to dimension differences. GMP and GMC contain same loading volumes, but wall thickness causes different heat conductivity. Nevertheless, these two containers had inner diameter less than 0.4 mm and could achieve higher cooling rates, better than other vessels like OPS (He *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008).

Harmful effects of vitrification solutions or vitrification procedure *per se* may impair development kinetics, causing viable embryos to delay development (Bertolini *et al.*, 2005). Taking into account this information, we used differential staining to obtain more accurate information about embryo quality and embryo cell differentiation. Results showed that

vitrified embryos disregarding embryo container, have lower cell numbers than embryos in control group. Cell membranes suffering cryoinjuries during cooling and warming procedures (Mazur, 1970) are probably responsible for this cell number reduction showed by vitrified embryos, which could impair further embryo development (Kaidi *et al*, 2001). ICM cell number of embryos loaded into GMP or GMC survival rate after warming, did not differ from ICM cell number in control group embryos. This observation shows that ICM cells of embryos loaded into GMP or GMC were well protected against the cryoinjuries during vitrification (He *et al*, 2008). However vitrified embryo TE cells were not well protected like the ICM cells, when we looked at control group TE cell numbers. On the other hand, cell number (total number, ICM and TE) did not differ among vitrified embryos loaded into GMP or GMC.

## CONCLUSION

Manufactured GMC (Brand®) tested showed same efficiency as GMP to load mouse blastocysts for vitrification.

## REFERENCES

- Arav, A. Vitrification of oocytes and embryos. *In: Embryonic Development and Manipulation in Animal Production*. Lauria, A. And Gandolfi, F. (eds.), Portland Press, London and Chapel Hill, cap. 22, 255–264, 1992.
- Arav, A.; Zeron, Y. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. **Theriogenology**, 47; 341. 1997.
- Bertolini, M.; Lange, M. C.; Rodrigues, J. L. *In vitro* and *in vivo* survival of mouse morulas and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, 245-251, 2005.
- Bunn S. *et al*. Vitrification of immature bovine oocytes loaded in containers with distinct heat conductivities. **Acta Scientiae Veterinariae** 34 (Suppl 1), 322, 2006.
- Cho, S. K. *et al*. Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). **Animal Reproduction Science**, v. 73, 151–158. 2002.
- Cremades, N. *et al*. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. **Human Reproduction**, v. 19, p. 300-

305, 2004.

He, X. *et al.* Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: A study using murine embryonic stem cells. **Cryobiology**, v.56, 223-232, 2008.

Hredzák, R. *et al.* Influence of slow-rate freezing and vitrification on mouse embryos. **Acta Vet. Brno**, v.74, 23–27, 2005.

Kaidi, S. *et al.* Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 65, 1127–1134, 2001.

Kong, I. K. *et al.* Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology**, v. 53, 1817-1826, 2000.

Lane, M.; Schoolcraft, W. B.; Gardner, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and Sterility**, v. 72,1073–1078, 1999.

Martino, A.; Songsasen, N.; Leibo, S. P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v. 54, 1059–1069, 1996.

Matsumoto, H. *et al.* Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, 139–144, 2001.

Mazur, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v.168, 939-949, 1970.

Palasz, A. T.; Mapletof, R. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 14; p. 127-149, 1996.

Rall, W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, 387-402, 1987.

Rall, W. F.; Fahy, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature**, v. 313; 573-575, 1985.

Sun, X. *et al.* Engelhardt JF. Efficient term development of vitrified ferret embryos using a novel pipette chamber technique. **Biology of Reproduction** doi:10.1095/biolreprod.107.067371, 2008.

Thouas, G. A. *et al.* Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocyst. **Reproductive BioMedicine Online** v.3(1), 25-29, 2001.

Tominaga, K.; Hanada, Y. Gel Loading tips as containers for vitrification of *in vitro*

produced bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 47(5), 267-273, 2001.

Vajta, G. Vitrification of bovine oocytes and embryos. **Embryo Transfer Newsletter** 15:12-8, 1997.

Vajta, G. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev** v.5; 53-58, 1998.

Vanderzwalmen, P.; Bertin, G.; Debauche, C. H.; Standaart, V.; Schoysman, E. In vitro survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. **Fertility and Sterility**, v. 74, 215-216, 2000.

Vieira, A. D.; Forell, F.; Feltrin, C.; Rodrigues, J. L. Calves Born after Direct Transfer of Vitrified Bovine *In Vitro*-produced Blastocysts Derived from Vitrified Immature Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p 314-318, 2008.



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A vitrificação mostrou ser um processo eficaz e promissor na manutenção e preservação de material genético. A busca por metodologias que permitam o aumento das taxas de sobrevivência embrionária faz com que a criação de novos protocolos baseados na associação de crioprotetores seja um ponto importante no desenvolvimento de futuros experimentos.

O conhecimento das características bioquímicas dos crioprotetores é essencial para o entendimento dos mecanismos de ação deles sobre as células. Isto facilitará a implementação de novas combinações que visem diminuir a toxicidade e aumentar as taxas de sobrevivência embrionária após a exposição a diferentes soluções de vitrificação.

Futuras pesquisas devem ser conduzidas para determinar as velocidades adequadas de resfriamento e aquecimento, das soluções compostas com dimetilformamida, direcionadas para evitar a formação de hidratos. Com isto, viabilizar o emprego destas soluções na vitrificação de embriões mamíferos.

Por outro lado, torna-se necessário também avaliar o efeito crioprotetor de outras combinações de soluções de vitrificação compostas com dimetilformamida, realizando modificações tanto na concentração, tempos e temperaturas de exposição, como no tipo de crioprotetores permeáveis e não permeáveis. A utilização de crioprotetores extracelulares da classe dos sacarídeos é uma das possibilidades a ser testada visando controlar a entrada da dimetilformamida nas células, simultaneamente protegendo a membrana plasmática, como é o caso da trealose. Dessa forma, as soluções crioprotetoras terão influência sobre as taxas de sobrevivência embrionária diminuindo o efeito tóxico sobre as células.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P. R. L. *et al.* Vitricificação de embriões *Mus musculus* em 9,0 M de etileno-glicol. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, p. 21-29, 1997.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**. v. 89, p. 105–113, 2005.
- ANCHORDOGUY, T. J.; CECCHINI, C. A.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. **Cryobiology**. v. 28, p. 467-473, 1991.
- ANDRADE, T. P.; RODRIGUES, J. L. Efeito da concentração de sacarose na solução crioprotetora na congelação rápida de embriões *Mus musculus*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.11, p. 69-72, 1987.
- ARAV, A. Vitricification of oocytes and embryos. *In*: LAURIA, A., GANDOLFI, F. (Eds.), **Embryonic Development and Manipulation in Animal Production**. Portland Press, London and Chapel Hill. cap. 22, p. 255–264, 1992.
- ARAV, A.; ZERON, Y. Vtrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (mds) is effected by the composition and the concentration of the vitricification solution and by the cooling conditions. **Theriogenology**. v. 72, p. 341. 1997.
- ARAV, A.; ZERON, Y.; OCHERETNY, A. A new device and method for vitricification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 248, 2000.
- ASADA, M. ISHIBASHI, S. IKUMI, S. FUKUI, Y. Effect of polyvinil alcohol (PVA) concentration during vitricification of *in vitro* matured bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 58, p. 1199-1208, 2002.
- ASSAF, S. S. *et al.* Vitricificação de embriões *Mus domesticus domesticus* contidos em volumes diferentes de 9,0 M de etileno glicol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 990, 2007.
- BAUDOT, A.; BOUTRON, P. Glass-Forming Tendency and Stability of Aqueous Solutions of Diethylformamide and Dimethylformamide. **Cryobiology**. v.37, p.187-199, 1998.
- BAUDOT, A.; ALGER, L.; BOUTRON, P. Glass-Forming Tendency in the System Water–Dimethyl Sulfoxide. **Cryobiology**. v. 40, p. 151-158, 2000.
- BAUDOT, A. *et al.* Towards whole sheep ovary cryopreservation. **Cryobiology**. v.55,

p.236–248, 2007.

BERTOLINI, M. SANT'ANNA, D. M. RODRIGUES, J. L. Tempo de equilíbrio na solução intracelular e sobrevivência *in vitro* de mórulas e blastocistos *Mus musculus* vitrificados. **Revista Arquivos da Faculdade de Veterinaria da UFRGS**, v. 22, p. 6-15, 1994.

BERTOLINI, M.; LANGE, M. C.; RODRIGUES, J. L. *In vitro* and *in vivo* survival of mouse morulas and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 245-251, 2005.

BIELANSKI, A. NADIN-DAVIS, S. SAPP, T. LUTZE-WALLACE, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**. v. 40, p.110-116, 2000.

BIELANSKI, A. *et al.* Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**.v. 46, p. 146-152, 2003.

BOURNE, W. M.; NELSON, L. R. Human corneal studies with a vitrification solution containing dimethyl sulfoxide, formamide, and 1,2-propanediol. **Cryobiology**. v.31, p. 522-530, 1994.

BOUTRON, P. More accurate determination of the quantity of ice crystallized at low cooling rates in the glycerol and 1,2-propanediol aqueous solutions: Comparison with equilibrium. **Cryobiology**.v. 21, p. 183–191, 1984.

BUNN, S. *et al.* Reduction in cryoprotectant concentrations on the vitrification of immature bovine oocytes, under a high cooling rate. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 309, 2006.

CHEN, S. U. *et al.* Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. **Human Reproduction**, v.16, p. 2350-2356, 2001.

CHEN, S. L.; TIAN, Y. S. Cryopreservation of flounder *Paralichthys olivaceus* embryos by vitrification. **Theriogenology**. V. 63, P.1207–1219, 2005.

CHECURA, C. M.; SEIDEL, J. R. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 67, p. 919-930, 2007.

CHIAN, R. *et al.* High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. **J Reprod. Dev.** v. 50, p. 685-696, 2004.

CHO, S. K. *et al.* Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). **Animal Reproduction Science**, v. 73, p. 151-158, 2002.

CÔRTEZ, C. G. P.; RODRIGUES, J. L. Sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em meio contendo 9,0 M de etileno glicol na presença de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 461-467, 2000.

COSTA, A.A.V. Vitrificação de embriões *Mus domesticus domesticus* envasados em palheta convencional dotada de peça metálica. 35 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária**, Porto Alegre, 2007.

CREMADES, N. *et al.* Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. **Human Reproduction**, v. 19, p. 300-305, 2004.

CSEH, S. *et al.* Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions. **Theriogenology**, v. 52, p. 103-113, 1999.

CUELLO *et al.* Effect of the cryoprotectant concentration on the *in vitro* embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. **Cryobiology**, v.56, p. 189-194, 2008.

DE LA TORRE, J. C.; STANLEY, W. J. Pharmacology of dimethyl sulfoxide: an update. **Cryobiology**, v.55, p.351, 2007.

DING, F. H.; XIAO, Z. Z.; LI, J. Preliminary studies on the vitrification of red sea bream *Pagrus major* embryos. **Theriogenology**, v. 68, p. 702-708, 2007

DINNYÉS, A.; *et al.* High development 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.

EMILIANI, S. *et al.* Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. **Human Reproduction**, v. 15, p. 905-910, 2000.

EL-GAYAR, M.; GAULY, M.; HOLTZ, W. One-step dilution of open-pulled-straw (OPS)-vitrified mouse blastocysts in sucrose-free medium. **Cryobiology**, 2008.

EROGLU, A. *et al.* Progressive elimination of microinjected trehalose during mouse embryonic development. **Reprod Biomed Online**, v.10, p.503-510, 2005.

EUM, J. H. *et al.* Long-term liquid nitrogen vapor storage of mouse embryos cryopreserved using vitrification or slow cooling. **Fertil Steril (In press)**, 2008.

FAHY, G. M. *et al.* Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, p. 407 - 426, 1984.

FAHY, G. M.; LEVY, D. I.; ALI, S. E. Some emerging principles underlying the physical

- properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**, v. 24, p. 196-213, 1987.
- FAHY, G. M. *et al.* Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**. v.27,p. 247-268, 1990.
- FAHY, G. M. *et al.* Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**. v. 48, p.22–35, 2004.
- FAHY, G. M. ‘Cryopharmacological’ aspects of vitrification solutions. **Cryobiology**. v.55, p.351-352, 2007.
- FERREIRA, A. *et al.* Uso de dimetilformamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.35, n.2, p.452-456, 2006.
- FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reprod Biomed Online**. v. 9, p. 680-691, 2004.
- FUJINO, Y. *et al.* Metal mesh vitrification (MMV) method for cryopreservation of porcine embryos. **Theriogenology** v. 70, p. 809-817, 2008
- FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B. R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**. v. 32, p. 139-156, 1995.
- GONZALES, R. A. F. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozoide bovino. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinária) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2004.
- GRAVES-HERRING, J. E.; BOONE, W. R. Blastocyst rate and live births from vitrification and slow-cooled two-cell mouse embryos. **Fertility and Sterility**, 2008
- GREGORY, R. M.; RODRIGUES, J. L. Utilização de duas concentrações de glicerol no congelamento de embriões bovinos. **Anais do VI simpósio nacional de reprodução animal**. Belo Horizonte, p. 375, 1985.
- HE, X.; PARK, E. Y. H.; FOWLER, A.; YARMUSH, M. L.; TONER, M. Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: A study using murine embryonic stem cells. **Cryobiology** v. 56 p.223-232, 2008.
- HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M.; POWERS, R. D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 161-168, 1996.
- HOTZEL, M. J.; RODRIGUES, J. L. Efeito do período de equilíbrio na solução crioprotetora intracelular a 20°C na sobrevivência *In Vivo* de blastocistos de *Mus musculus*

- vitrificados. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 20, p. 173-187, 1992.
- HREDZÁK, R. *et al.* Influence of slow-rate freezing and vitrification on mouse embryos. **Acta Vet. Brno**, v.74, 23–27, 2005.
- ISACHENKO, V. *et al.* Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 445-452, 2003.
- ISHIMORI, H.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. **Theriogenology**. v.37, p.481-487, 1992.
- JANIK, M. KLEINHANS, F. W.; HAGEDORN, M. Overcoming a permeability barrier by microinjecting cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). **Cryobiology**. v.41, p.25–34, 2000.
- JIN, B. *et al.* Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. **Cryobiology**, v.56, 233-240, 2008.
- KAIDI, S. *et al.* Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 65, 1127–1134, 2001.
- KASAI, M. *et al.* A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 91 – 97, 1990.
- KASAI, M. *et al.* High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1042-1046, 1992.
- KASAI, M. Simple and efficient methods 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. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 1, p. 1-9, 2002.
- KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive Biomedicine online**. v. 9, p. 164-170, 2004.
- KONG, I. K. *et al.* Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology**, v. 53, p. 1817-1826, 2000.
- KONO, T.; SUZUKI, O.; TSUNODA, Y. Cryopreservation of rat blastocysts by vitrification. **Cryobiology**. v. 25, p.170-173, 1988.
- KULESHOVA, L. L. *et al.* Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes.

**Cryobiology**, v. 38, p. 119-130, 1999.

KULESHOVA, L. L.; SHAW, J. M.; TROUNSON, A. O. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. **Cryobiology**, v. 43, p. 21-31, 2001.

KULESHOVA, L. L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 449-454, 2002.

KUWAYAMA, M. *et al.* Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, p. 608-614, 2005.

LAHNSTEINER, F. The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Theriogenology**, v. 69, p. 384–396, 2008.

LANDA, V.; TEPLA, O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. **Folia Biol (Praha)**, v. 36, p. 153-158. Abstract, 1990.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W. B.; GARDNER, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 1073-1078, 1999.

LANGE, M. C. Vitricação de diferentes estádios embrionários de *Mus domesticus domesticus* envasados em microvolume e expostos ao nitrogênio líquido a  $-200^{\circ}\text{C}$ . Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária**, Porto Alegre, 2008.

LEIBO, S. P.; ODA, K. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. **Cryo-Letters** 14, 133–144, 1993.

LIEBERMANN, J. *et al.* Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 4, p. 146-150, 2002.

LIEBERMANN, J.; DIETL, J.; VANDERZWALMEN, P.; TUCKER, M. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now?. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 7, p. 623-633, 2003.

LOPES, R. F. F.; RODRIGUES, J. L. Vitricação de embriões *Mus musculus*. **In Anais: III Reunião Anual e I Reunião Internacional da Sociedade Brasileira de Transferência de embriões**, Santa Maria – RS, p. 8, 1988.

LOPES, R. F. F.; RODRIGUES, J. L. Sobrevivência *in-vivo* de embriões murideos vitrificados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 15, p. 75-80, 1991.

LÓPEZ-BÉJAR, M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. **Theriogenology**, v. 58, p. 1541-1552, 2002.

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.

MASSIP, A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. **Reprod Dom Anim** v.36, 49-55, 2001.

MATSUMOTO, H. *et al.* Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, p. 139-144, 2001.

MAZUR, P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. **Cryobiology**. v.2, p.181-192, 1966.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v.168, 939-949, 1970.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos. In: **International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination**, 9. *Proceedings*. Madrid, p. 99-114, 1980.

MAZUR, P.; SCHNEIDER, U. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. **Cell Biophys**, v. 8, p. 259-285, 1986. (Abstract).

MEZZALIRA, A. *et al.* Vitricação de oócitos bovinos em micropipetas de vidro. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.27, p.262, 1999. (Abstract).

MIGISHIMA, F. *et al.* Successful Cryopreservation of Mouse Ovaries by Vitrification. **Biology of Reproduction**. v.68, p. 881-887, 2003.

MIYAMOTO, H.; ISHIBASHI, T. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 54, p. 427-432, 1978.

MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T.; MOGAS, T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**, 2008

MUKAIDA, T. *et al.* Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 2874-2879, 1998.

NAKAO, K.; NAKAGATA, N.; KATSUKI, M. Simple and efficient vitrification



procedure for syopreservation of mouse embryos. **Exp. Anim.** v. 46, p. 231-234, 1997.

NIVIA, A. Sobrevivência *in vitro* de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em macro ou microvolume de crioprotetor. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária**, Porto Alegre, 2008.

OLIVEIRA, E. C. S.; JULIANI, G. C.; MARQUES, J. R. A. P; HENRY, M. *In vitro* evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, p. 1116-1122, 2006.

PALASZ, A. T.; MAPLETOFT, R. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 14, p. 127-149, 1996.

PALHA, M. D. C.; LOPES, R. F. F.; RODRIGUES, J. L. Influência do tempo de equilíbrio na vitrificação de mórulas compactas e blastocistos de *Mus musculus*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 15, p. 65-73, 1991.

PEDRO, P. B. *et al.* Permeability of mouse oocyte and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. **J. Reprod. Dev.** v. 51, p. 235-246, 2005.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**. v. 9, p. 267-277, 2008.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

RALL, W. F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.24, 387-402, 1987.

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

RUBIN, M. I. B. *et al.* Bacterial contamination in liquid nitrogen containers. **Proceedings Brazilian society of embryo transfer**. SBTE 2005. p. 406, 2005.

SAHA, S. *et al.* Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. **Cryobiology** v. 33, p.291-9, 1996.

SANTOS, R. M. *et al.* Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. **Ciência Rural**. v. 36, p. 1501-1506, 2006.

SEKI, S.; MAZUR, P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. **Biol Reprod.** v. 79, 727-737, 2008.

SHAW, J. M. *et al.* Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline

containing PVP, Ficoll or Dextran. **Cryobiology**, v. 35, p. 219-229, 1997.

SHAW, J. M.; JONES, G. M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. **Human Reproduction update**, v. 9, p. 583-605, 2003.

SIQUEIRA-PYLES, E. S. C.; FERNANDES, C. B.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Use of etilene-glycol, dimethylsulfoxid and dimethylformamide in the vitrification of bovine embryos in open pulled straws. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2004.

SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v. 38, p. 95-105, 1999.

STEFANI, J. S. Transferencia de blastocistos de camundongos (*Mus musculus*) diferindo o numero e a sincronizacao estral. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 1983.

SQUIRES, E. L.; KEITH, S. L.; GRAHAM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v. 62, p. 1056-1065, 2004.

SUKHNO, I. V.; BUZKO, V. Y. ;PANYUSHKIN, V. T. The Physicochemical characteristics of heteroassociates in the N,N-Dimethylformamide-Water System. **Russian Journal of Physical Chemistry**. v. 82, 717-722, 2008.

SUN, X. *et al.* Engelhardt JF. Efficient term development of vitrified ferret embryos using a novel pipette chamber technique. **Biology of Reproduction** doi:10.1095/biolreprod.107.067371, 2008.

TAKAHASHI, T. *et al.* Vitrification of human monocytes. **Cryobiology**. v.23, p.103-115. 1986.

TANG, M. WARING, A. J.; HONG, M. Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion. **J Magn Reson**. v.184, p. 222-7, 2007.

THOUAS, G. A. *et al.* Simplified technique for differential staining of inner cell mass and tropectoderm cells of mouse and bovine blastocyst. **Reproductive BioMedicine Online** v.3(1), 25-29, 2001.

TITTERINGTON, J. L.; ROBINSON, J.; KILLICK, S. R.; HAY, D. M. Synthetic and biological macromolecules: protection of mouse embryos during cryopreservation by vitrification. **Hum Reprod**. v. 10, p. 649-653, 1995.

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y. Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 47, p. 267-273, 2001.

- VAJTA, G. Vitrification of bovine oocytes and embryos. **Embryo Transfer Newsletter** 15:12–8, 1997.
- VAJTA, G. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53–58, 1998.
- VAJTA, G. *et al.* The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**. v. 52, p.939-948, 1999.
- VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 357-364, 2000.
- VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, p.779-796, 2006.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v. 65, p. 236–244, 2006.
- VANDERZWALMEN, P. *et al.* “*In vitro*” survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocyst after vitrification in an hemi-straw (HS) system. **Fertility and Sterility**, v. 74, p. 215-216, 2000.
- VIDAMENT, *et al.* Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**. v. 58, p. 249-251, 2002.
- VIEIRA, A. D.; FORELL, F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J. L. Calves Born after Direct Transfer of Vitrified Bovine *In Vitro*-produced Blastocysts Derived from Vitrified Immature Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p 314-318, 2008.
- VICENTE, J. S.; GARCÍA-XIMÉNEZ, F. Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae. **Theriogenology**. v. 42, p. 1205-1215, 1994.
- WERLICH, D. E. *et al.* Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre RS, v. 34, n. 1, p. 77-82, 2006.
- WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryo frozen to -196 and -296°C. **Science**, v. 178, p. 411-414, 1972.
- 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 science**, v. 11, 1071-1079, 1972.

WOOD, M. J. et al. High Rates of Survival and Fertilization of Mouse and Hamster Oocytes after Vitrification in Dimethylsulphoxide. **Biology of Reproduction**. 49, p.489-495, 1993.

WOODS, E. J.; BENSON, J. D.; AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v. 48, p. 146-156, 2004.

WOWK, B. *et al.* Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**. v. 40, p. 228-236, 2000.

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology**. v. 67, p. 81-89, 2007.

YOSHINO, J.; KOJIMA, T.; SHIMIZU, M.; TOMIZUKA, T. Cryopreservation of porcine blastocysts by vitrification. **Cryobiology**. v. 30, p. 413-422, 1993.

## ANEXOS

### PROTOCOLO COLORAÇÃO DIFERENCIAL

Descrita por Thouas 2001. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocyst.

### PREPARAÇÃO SOLUÇÕES

- **SOLUÇÃO 1.**
  - Solução de PBS + BSA (3 mg/ml)
  - 1% Triton X
  - 100 µg/ml de Iodeto de Propideo
  
- **SOLUÇÃO 2.**
- 25 µg/ml de Hoechst diluídos em 100% Etanol

### METODOLOGIA

- Dentro de uma placa NUNC de 4 poços, se colocam cada uma das soluções, dentro dos poços 1 e 3.
- Os embriões são colocados na solução 1 por um período de 10 seg
- Posteriormente são transferidos na solução 2 e colocados a incubar a 4 °C durante a noite
- No dia seguinte são retiradas da solução e colocadas sobre uma lamina com uma gota de glicerol, e fixadas com uma lamínula.
- Ler na hora com microscópio de fluorescência
- As células que ficam de vermelhas pertencem às células do trofoectodermo e as que ficam azuis pertencem às células da massa interna do embrião.