

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
COMISSÃO DE ESTÁGIOS**

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

Felipe Ledur Ongaratto

PORTO ALEGRE

2009/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
COMISSÃO DE ESTÁGIOS**

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS

**autor: Felipe Ledur Ongaratto
orientador: José Luiz Rodrigues
co-orientadora: Paula Rodriguez
Villamil**

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para a obtenção da Graduação em Medicina Veterinária.

PORTO ALEGRE

2009/2

O58c Ongaratto, Felipe Ledur
Criopreservação de embriões bovinos / Felipe Ledur
Ongaratto - Porto Alegre: UFRGS, 2009/2.

27f.; il. – Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Comissão de Estágio, Porto Alegre, BR-RS, 2009/2. José Luiz Rodrigues, Orient. , Paula Rodriguez Villamil, Co-orient.

1. Criopreservação 2. Crioprotetores 3. Embriões
4. Vitrificação I. Rodrigues, José Luiz, Orient. II. Villamil,
Paula Rodriguez, Co-orient. III. Título.

CDD 619

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Carlos e minha mãe Vera, por todo o apoio e incentivos durante essa longa caminhada, acreditando em minhas decisões e nunca medindo esforços para que eu pudesse ser um estudante.

À minha irmã Fernanda e meu cunhado Charles que estiveram ao meu lado e trouxeram um sobrinho e afilhado para alegrar a nossa família.

À minha família que sempre acreditou no meu potencial e soube me incentivar em todas as horas.

À minha namorada Paula, que me ajudou muito durante a parte final da graduação e principalmente no período de estágio, fornecendo moradia e afeto longe de casa.

Ao professor Dr. José Luiz Rodrigues, que me acolheu como bolsista durante quatro anos e me passou conhecimentos muito valiosos para a minha formação.

Aos colegas de laboratório, pela amizade e companheirismo nos tempos de bolsista.

Aos mestres que fazem da Faculdade de Veterinária da UFRGS uma das mais importantes e respeitadas do Brasil.

Aos colegas de graduação, que se tornaram grandes amigos durante este grande período de estudos.

Aos meus amigos, que sempre foram uma válvula de escape nas horas de nervosismo e apreensão, com churrascos e eventos afins.

Ao meu orientador de estágio Dr. Gabriel A. Bó, ao Dr. Humberto Tríbulo, Ricardo Tríbulo e toda equipe do Instituto de Reproducción Córdoba, que me receberam muito amavelmente e me passaram conhecimentos valiosos e se tornaram amigos.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que estiveram direta e indiretamente envolvidos nessa minha conquista. Muito Obrigado!

RESUMO

O desenvolvimento das técnicas de criopreservação de embriões teve seu início a partir da década de 70, com o aumento de estruturas excedentes provenientes da coleta de embriões e o interesse de preservar animais de alto valor genético. Com a necessidade de conservar estes embriões, diversos protocolos foram descritos em busca de resultados satisfatórios nas taxas de recuperação destas estruturas crioconservadas.

O estudo sobre crioprotetores e a busca por agentes que fossem capazes de preservar as células e que ao mesmo tempo não provocassem danos, permitiu a criação de protocolos bem definidos de criopreservação.

O congelamento de embriões através de curvas de resfriamento e o posterior desenvolvimento de máquinas automatizadas, que permitem congelar grande quantidade de estruturas com segurança, foram uma conquista para os produtores e veterinários envolvidos na coleta e transferência comercial de embriões.

Com o passar dos anos e a introdução da produção *in vitro* de embriões bovinos, observou-se que este tipo de embriões não respondia de igual forma que os produzidos *in vivo*. Assim, novos estudos a respeito de crioprotetores e principalmente velocidades de resfriamento foram feitos a fim de obter taxas de recuperação semelhantes às alcançadas com os embriões produzidos *in vivo*. Dentre os avanços recentes na pesquisa da criopreservação destaca-se a vitrificação. Esta técnica tem se mostrado eficiente na crioconservação de embriões provenientes da PIV.

Este trabalho tem por objetivo apresentar os princípios de crioconservação de embriões e as técnicas utilizadas para este fim. Além disso, explicar as diferenças entre o congelamento e a vitrificação de embriões bovinos e as diferenças entre os embriões produzidos *in vivo* e os *in vitro*.

Palavras chave: Criopreservação, embriões, crioprotetores, vitrificação.

ABSTRACT

The development of cryopreservation techniques of embryos had its start in the 70's, with the increasing of structural surpluses from the embryo collections and the need to preserve animals of high genetic value. With the need to conserve these embryos, several protocols have been described in the search for satisfactory results in the recovery rates of these cryopreserved structures.

The study of cryoprotectants and the search for agents that were able to preserve the cells and at the same time not caused any harm, allowed the creation of well defined protocols of cryopreservation.

The freezing of embryos by means of cooling curves and further development of automated machines that allow large amounts of frozen structures safely, were a victory for producers and veterinarians involved in the commercial collection and embryo transfers.

Over the years and with the introduction of in vitro production of bovine embryos, it was observed that this type of embryos did not respond the same way that the in vivo products. Thus, new studies about cryoprotectants and especially velocities of cooling were made to obtain recovery rates similar to those achieved with embryos produced in vivo. Among the recent advances in cryopreservation research stands vitrification. This technique has proven effective in cryopreservation of PIV embryos.

This paper aims to present the principles of cryopreservation of embryos and the techniques used for this purpose. Also, explain the differences between freezing and vitrification of bovine embryos and the differences between the embryos produced in vivo and in vitro.

Keywords: cryopreservation, embryos, cryoprotectants, vitrification.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 8 |
| 2. PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO | 9 |
| 3. CRIOPROTETORES | 10 |
| 4. PROCEDIMENTOS PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES | 12 |
| 4.1 Congelamento de embriões..... | 13 |
| 4.1.1 Método tradicional de congelamento..... | 13 |
| 4.2 Descongelamento..... | 14 |
| 4.3 Congelamento X Vitrificação..... | 15 |
| 4.4 Vitrificação..... | 16 |
| 4.4.1 Método OPS – Open Pulled Straw..... | 18 |
| 4.4.2 Nitrogênio superresfriado..... | 19 |
| 5. CONCLUSÃO | 20 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 21 |

1. INTRODUÇÃO

Na década de 70, quando a transferência comercial de embriões teve seu início, a sincronização dos estros já era utilizada, porém nem sempre havia receptoras em número suficiente para efetuar as transferências. Consequentemente, descartavam-se os embriões excedentes ou os cultivavam à temperatura ambiente ou próximo dos 0°C, até no máximo por 24 horas (HASLER *et al.*, 1997). Os procedimentos de criopreservação foram desenvolvidos como consequência do interesse em preservar embriões de animais de alto valor genético, o que proporcionou a comercialização destes genomas ao redor do mundo (VAJTA, 2000). Assim, a criopreservação de embriões se tornou parte integrante da reprodução assistida, especialmente de espécies domésticas (LEIBO *et al.*, 1996; PALASZ & MAPLETOFT, 1996; KULESHOVA & LOPATA, 2002).

A evolução das técnicas de criopreservação de embriões bovinos proporcionou uma série de vantagens, tais como a utilização de receptoras em estro natural, o aproveitamento de receptoras excedentes ao número de embriões obtidos no dia da colheita, a organização de grandes programas de descongelamento e transferência de embriões (TE), o planejamento do período de nascimento de terneiros de acordo com o interesse das propriedades, a formação de bancos de germoplasma e a facilidade de comercialização de material genético com menores custos de transporte, não necessitando o traslado de animais ou transporte com tempo reduzido.

A criopreservação de alguns tipos de embriões ainda não proporcionou taxas de sobrevivência embrionária satisfatórias, seja utilizando os métodos de congelação (através de curvas), ou utilizando os métodos rápidos de criopreservação (congelação ultrarápida e vitrificação). Por esta razão os estudos na área da criobiologia continuam em constante evolução, buscando alternativas para melhorar a viabilidade de embriões criopreservados.

Apesar dos índices comercialmente satisfatórios de nascimentos obtidos com a transferência a fresco de embriões bovinos produzidos *in vitro* (PIV), o total aproveitamento da potencialidade da técnica é dependente da possibilidade da criopreservação destes embriões. A baixa viabilidade de ovócitos e embriões produzidos *in vitro* submetidos à criopreservação se deve principalmente a sensibilidade que essas estruturas apresentam ao resfriamento. Quando expostos as temperaturas correspondentes à fase termotrópica de transição dos lipídios (ARAV *et al.*, 1996), estas estruturas sofrem diferentes graus de alterações, de acordo com o tempo de exposição, característica que torna

a vitrificação a técnica de criopreservação mais promissora, por possibilitar a rápida passagem através dessa faixa crítica de temperatura (VIEIRA, *et al.*, 2008).

Usualmente as pesquisas na área de criopreservação incluem ensaios sobre o tipo e a concentração do crioprotetor, o tempo de exposição dos embriões às soluções crioprotetoras, a velocidade de resfriamento, a temperatura de imersão em nitrogênio líquido, o envase utilizado, a velocidade de aquecimento e o método de remoção do crioprotetor.

2. PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação tem por objetivo manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível o armazenamento de células e tecidos por tempo indeterminado (RODRIGUES, 1992). O primeiro sucesso alcançado por essa técnica foi obtido simultaneamente por Whittingham *et al.* (1972) e Wilmot (1972) utilizando embriões de camundongos.

Um dos princípios básicos da crioconservação é o da necessidade da desidratação das células antes do resfriamento. Caso esta situação não seja alcançada, a possibilidade de formação de cristais de gelo e o conseqüente dano às células serão praticamente inevitáveis. No entanto, a remoção demasiada de água das células também pode ser deletéria (SEIDEL Jr., 1986).

Pickett (1986) destaca que os danos causados aos tecidos durante os processos de criopreservação e aquecimento são devido principalmente a: formação de cristais de gelo intracelulares, que afetam a estrutura da célula; concentração de soluto resultante do processo de desidratação que ocorre durante a congelação tanto no meio extra como intracelular; interação entre esses dois fatores.

A congelação provoca um aumento da pressão osmótica na célula, uma vez que a concentração total de solutos dentro e fora deve estar sempre em equilíbrio. Em resposta a esse estresse, a água sai da célula e o soluto entra. O processo cessa quando a concentração de soluto se torna grande o bastante para prevenir futuras transformações de água em gelo (STOREY & STOREY, 1990).

De acordo com Mazur (1970), as células mamíferas, independente do grau de desidratação, não sobrevivem a congelamentos abaixo dos -20 °C em fluidos teciduais ou soluções salinas, sem a presença de um crioprotetor. Portanto, independente da velo-

cidade de resfriamento adotada na criopreservação de embriões, a adição de um crioprotetor é fundamental para a sobrevivência das células embrionárias.

Segundo Seidel Jr. (1986) os crioprotetores promovem o abaixamento do ponto de congelamento do meio, conferindo um período maior para remoção da água intracelular durante o resfriamento prévio ao congelamento da água. Esses possuem ainda a capacidade de interagir com as membranas celulares, auxiliando-as a sobreviverem ao estresse provocado pelas mudanças físicas. Em adição, estas substâncias têm a aptidão de proteger os embriões contra as lesões causadas pela elevação das concentrações dessas soluções, no processo de formação do gelo, durante o resfriamento.

3. CRIOPROTETORES

Independente da técnica, todos os métodos de criopreservação necessitam de crioprotetores que possuem a função de proteger as células e tecidos durante a congelamento e a descongelamento. Os crioprotetores são divididos em duas categorias: intracelulares, ou permeáveis, (como dimetilsulfóxido - DMSO, metanol, etanol, glicerol - GLY, etilenoglicol - EG, 1,2 propanodiol - PROH, etc.) e extracelulares, ou impermeáveis, (como lactose, glicose, sacarose, polivinilpirrolidona - PVP, rafinose, manitol, sorbitol, trealose, etc) (NIEMANN, 1991). Essas duas classes de crioprotetores são usadas separadamente ou associadas para diferentes tipos de protocolos de criopreservação (IM *et al.*, 1997; YOUNG *et al.*, 1998).

Os crioprotetores intracelulares são importantes constituintes da solução de congelamento/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.

Uma das funções dos crioprotetores é de baixar o ponto de solidificação; isto é benéfico por várias razões, principalmente, porque fornece um maior tempo para a ocorrência da desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares. A concentração dos crioprotetores, normalmente utilizada, pode causar uma queda do ponto de congelamento em 2 a 3 °C. Contudo, o efeito do abaixamento pode ser multiplicado várias vezes na solução mais concentrada, que está entre os cristais de gelo e o fluido intracelular. Então, o congelamento, especialmente o congelamento intracelular,

ocorre a temperaturas mais baixas na presença de crioprotetores, sendo esta uma vantagem (SEIDEL *et al.*, 1989).

A adição de crioprotetores permeáveis causa nas células uma retração temporária devido à concentração utilizada, que faz com que a água das células saia rapidamente por osmolaridade para diluir os crioprotetores. Contudo, dentro de poucos minutos, os crioprotetores permeiam as membranas da célula e então as concentrações de dentro e de fora da célula igualam-se, levando a água a entrar nas células, que retornam ao seu tamanho normal. A retração inicial das células que ocorre no momento do contato com os crioprotetores pode ser minimizada pela adição gradual do crioprotetor. Entretanto, esta retração aparentemente não causa grandes danos aos embriões, por isso, em alguns protocolos os crioprotetores são adicionados em uma única etapa (SEIDEL, 1996).

Os crioprotetores extracelulares ou não permeáveis incluem os açúcares tais como a galactose, glicose, trealose, manitol, sorbitol e sacarose. Isoladamente apresentam efeito estabilizador sobre as membranas, porém, não apresentam efeito crioprotetor eficaz (CROWE *et al.*, 1983). Sua principal utilização é em associação aos crioprotetores intracelulares uma vez que, por possuir alto peso molecular, permanecem no meio extracelular promovendo um período inicial de saída de água, com posterior ingresso dos crioprotetores intracelulares (ALLER *et al.*, 1995; FRIEDLER *et al.*, 1988). A adição de açúcares como sacarose, dextrose e trealose aumentam a sobrevivência *in vitro* de blastocistos após a vitrificação (SAITO *et al.*, 1994).

Outra função dos crioprotetores (extracelular) é a sua interação com a membrana celular exercendo uma ação estabilizadora durante as mudanças de um estado relativamente líquido, para um estado sólido e, talvez até mais importante, na volta para o estado líquido no descongelamento. Por exemplo, o crioprotetor parece diminuir a fragilidade das membranas impedindo que estas se rompam (SEIDEL, 1986).

Os crioprotetores são usualmente diluídos em solução salina tamponada (Phosphate Buffered Saline – PBS). No entanto, tem sido relatada também a diluição em meios como TCM-199 (Medium culture tissule – 199) (HAMANO *et al.*, 1992; OTOI *et al.*, 1993; PALASZ & MAPLETOFT, 1996; PAPIS *et al.*, 1999), H-CZBB (MARTINO *et al.*, 1996), TCM-199/Hepes (VAJTA *et al.*, 1998), acrescidos ainda de diferentes concentrações de antibióticos (OTOI *et al.*, 1995; OTOI *et al.*, 1998).

O crioprotetor não-permeável mais comum é a sacarose, que pode exercer um efeito osmótico significativo, e então é freqüentemente empregado na diluição ou rehidratação de oócitos e embriões após o descongelamento (HURTT, 1999).

A alta concentração de crioprotetores presentes em soluções de vitrificação atuam reduzindo a possibilidade de desvitrificação. Entretanto, a capacidade de indução e manutenção do estado vítreo difere entre os crioprotetores, em função de suas características químicas. Assim, soluções compostas por crioprotetores considerados como sendo fracos indutores da vitrificação, como o etileno glicol (EG) (BAUDOT *et al.*, 2000), necessitam ser utilizados em concentrações elevadas, aumentando o risco de toxicidade. Este problema pode ser minimizado pela associação com crioprotetores classificados como fortes indutores do estado vítreo, como o dimetil sulfoxido (DMSO) (BAUDOT *et al.*, 2000). A associação dos crioprotetores permite a obtenção de uma solução com boa capacidade de vitrificação, aliada à redução na toxicidade da solução. A capacidade de vitrificação também pode ser influenciada pela adição de açúcares ou macromoléculas, que atuam aumentando a molaridade da solução, favorecendo a obtenção do estado vítreo de forma semelhante ao aumento da pressão hidrostática (RALL, 1987). Outra alternativa para obtenção do estado vítreo é o uso de aditivos que atuam como bloqueadores da nucleação de gelo, como é o caso das “proteínas anticongelantes” (ARAV *et al.*, 1994) e dos polímeros sintéticos como o álcool polivinílico (WOWK *et al.*, 2000).

Os efeitos osmóticos determinados pela alta concentração da solução de vitrificação podem ser minimizados mediante a exposição dos embriões a soluções menos concentradas, reduzindo as lesões estruturais causadas por choque osmótico (ABE *et al.*, 2005). O uso de um período longo de exposição a uma solução de 2 a 4% de EG previamente a exposição às soluções mais concentradas aumenta a viabilidade das estruturas vitrificadas (PAPIS *et al.*, 2000), provavelmente por permitir uma adaptação osmótica e saturação mais homogênea do crioprotetor dentro das células.

4. PROCEDIMENTOS PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES

Durante os últimos anos diversas técnicas de criopreservação de embriões foram desenvolvidas. As substâncias crioprotetoras vêm sendo utilizadas em diversas concentrações e combinações. Tais substâncias são adicionadas às soluções em um único passo ou em etapas e os embriões criopreservados com diferentes curvas de resfriamento, sendo em alguns casos mergulhados diretamente no nitrogênio líquido a partir da temperatura ambiente. Da mesma maneira, a temperatura de aquecimento tem varia-

do de 20 a 37°C em banho-Maria ou ao ar e a retirada do crioprotetor realizada em um ou mais passos (LANDIM-ALVARENGA, 1995).

Apesar do conhecimento adquirido e das metodologias desenvolvidas ao longo dos últimos 30 anos de pesquisa na criobiologia, ainda continua sendo um desafio garantir a sobrevivência após a criopreservação dos embriões cultivados *in vitro* com taxas similares aos obtidos com os produzidos *in vivo*.

4.1 Congelamento de embriões

Com relação aos avanços obtidos na criobiologia ao longo dos anos, muito poucos protocolos de congelamento de embriões têm sido colocados na prática. A maioria dos embriões é congelada pelo método tradicional (PALASZ & MAPLETOFT, 1996).

Para a realização da congelamento de embriões existe a necessidade da utilização de uma máquina eletronicamente programável para monitorar a temperatura da curva de resfriamento antes que as palhetas contendo os embriões sejam imersas no nitrogênio líquido (HAFEZ, 1980).

Leibo & Mazur (1978) e Palasz & Mapletoft (1996) comentaram a importância da indução da cristalização do meio extracelular (“seeding”) antecedendo a congelamento do meio contendo os embriões, proporcionando as condições necessárias para uma retirada lenta de água do meio intracelular, através da formação de gelo no espaço extracelular. Os autores fazem algumas observações sobre o procedimento de “seeding” que devem ser consideradas: o instrumento a ser usado para efetuar a indução da cristalização deve ter temperatura abaixo da temperatura da amostra. Não é desejável empregar instrumentos muito grandes para provocar a indução da cristalização de amostras desproporcionalmente menores, pois a massa relativa de um instrumento muito maior resfria as amostras por temperaturas muito baixas. Os embriões são lesados caso haja neste momento congelamento intracelular. Instrumentos muito pequenos também não são desejáveis, por se aquecerem rapidamente após serem retirados do nitrogênio líquido. A indução da cristalização deve ser feita em locais onde preferencialmente não estejam os embriões, como no menisco superior da coluna central da palheta.

4.1.1 Método tradicional de congelamento

A velocidade de resfriamento, também denominada de curva de resfriamento, envolve uma série de procedimentos com o objetivo da redução gradual da temperatura do embrião, previamente adicionado ao meio crioprotetor, até seu armazenamento no

nitrogênio líquido. Denominou-se curva clássica de congelação os procedimentos descritos por Whittinghan (1980) para conservação de embriões mamíferos em baixas temperaturas.

Para o monitoramento da curva de resfriamento, podem ser utilizados diversos artifícios mecânicos, como o uso direto do botijão de nitrogênio líquido, fazendo um resfriamento gradual através da aproximação controlada dos embriões à lâmina de nitrogênio. Mais comumente, a curva é ser feita com o auxílio de uma máquina de congelamento, que pode ser programável e possui memorizadas diversas curvas de resfriamento, para diferentes espécies e com velocidades de resfriamento distintas.

O primeiro passo é o equilíbrio dos embriões no crioprotetor, em seguida é feito o envase para ser realizada a colocação das palhetas no aparelho congelador, é realizado o “seeding” e após inicia-se a curva de resfriamento de $-0,3$ a $-0,5^{\circ}\text{C}$ por minuto até -32°C . Estando os embriões a temperatura de -32°C , pode ser feita a imersão e conservação no nitrogênio líquido.

Os procedimentos adotados por Niemann (1991) para congelação de embriões bovinos foram: 1) adição de 1,4M glicerol feita em única etapa à temperatura ambiente, com período de equilíbrio de 20 minutos; 2) envase dos embriões em palhetas de 0,25mL, com três colunas de meio, separadas por duas colunas de ar, estando o embrião na coluna central; 3) transferência das amostras para o banho de álcool, à temperatura de -7°C , realizando-se o “seeding”; 4) após 5 minutos da indução da cristalização, a temperatura foi decrescida à $0,3^{\circ}\text{C}$ por minuto, até atingir -28°C ; 5) de -28°C à -35°C , a taxa de resfriamento foi de $-0,1^{\circ}\text{C}$ por minuto, sendo as palhetas mergulhadas em nitrogênio líquido.

Porém, Schneider & Mazur (1984) demonstraram uma adequada curva de resfriamento no processo de congelação de embriões bovinos que propicia uma eficiente remoção da água intracelular, assim descrita: 1) após a adição do crioprotetor e envase, as amostras devem ser transferidas para o recipiente do congelador previamente resfriado à temperatura próxima de -5°C para soluções a 1M glicerol e -7°C , para soluções a 1,5M; 2) as amostras devem ser equilibradas à temperatura do “seeding” por 5 a 10 minutos; 3) deve ser realizado o “seeding”; 4) a temperatura do “seeding” deve ser mantida por mais 10 minutos, para permitir equilíbrio da solução, inicialmente cristalizada; 5) as taxas de resfriamento devem estar entre $-0,3$ a $-0,5^{\circ}\text{C}$ por minuto até atingir temperaturas entre -30 a -40°C . É aconselhado manter as amostras no equipamento de congela-

ção por 15 a 30 minutos antes de imergi-las em nitrogênio líquido (-196°C), quando adotadas elevadas taxas de resfriamento.

4.2 Descongelamento

A sobrevivência dos embriões à descongelação depende da específica combinação do regime de resfriamento e taxas de descongelação. Embriões congelados sob taxas de resfriamento lentas (p.e. $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e imersão em nitrogênio às baixas temperaturas (p.e. -60 a -110°C), requerem procedimentos de descongelação lentos (p.e. $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Entretanto, a maioria dos processos de congelação é realizada às taxas de resfriamento entre $-0,1$ a $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e imersão das amostras em nitrogênio líquido às temperaturas entre -25 e -40°C (TAKEDA *et al.*, 1984).

A diluição do crioprotetor tem como função evitar a entrada muito rápida da água na célula, pois uma redução muito drástica na osmolaridade levaria à lise celular, de acordo com Schneider & Mazur (1984).

Com a introdução da sacarose nos procedimentos de diluição de substâncias crioprotetoras intracelulares, as técnicas tornaram-se mais rápidas e seguras, pois a sacarose atua como um tampão osmótico, mantendo constante a concentração do meio extracelular, regulando a velocidade de entrada da água e saída do crioprotetor do embrião, evitando o choque osmótico.

Somente após o emprego da sacarose e das palhetas francesas foi possível realizar o método “one-step” de descongelação (NIEMANN, 1991). Este método permite a transferência direta dos embriões para as receptoras na mesma palheta no qual foram congelados. Isto simplificou significativamente a tecnologia de TE, reduzindo o tempo requerido para preparar os embriões para serem transferidos e eliminando a necessidade de equipamentos especiais (PALASZ & MAPLETOFT, 1996). Estes pesquisadores relataram que 5000 embriões bovinos foram congelados e transferidos por este método e as taxas de gestação foram superiores a 55%, não diferindo de valores observados para embriões nos quais foi realizada a remoção dos crioprotetores antes da transferência.

4.3 Congelamento X Vitrificação

Comparativamente, o método de congelamento convencional, tem sido amplamente utilizado na criopreservação dos embriões, por ser uma técnica que a utilização de reduzida concentração de crioprotetores e permite a transferência direta dos embriões após o congelamento (VOLKEL & HU, 1992). Entretanto, a capacidade de prevenir a formação de gelo é limitada, e os resultados na criopreservação de embriões produzidos

in vitro ainda são variáveis (HASLER *et al.*, 1995; MASSIP *et al.*, 1995; HOCHI *et al.*, 1996, KAIDI *et al.*, 2001), sendo inferiores às taxas obtidas em embriões produzidos *in vivo* (ALVARENGA *et al.*, 2007; DINNYES & NEDAMBALE, 2009).

A razão pela qual existe esta variação na viabilidade dos embriões *in vitro*, comparados com os produzidos *in vivo*, está provavelmente nas características físicas deste tipo de embriões, que fazem com que sejam mais sensíveis no momento de serem expostos a baixas temperaturas (RODRIGUES, 1996; VAJTA *et al.*, 1997; DINNYES & NEDAMBALE, 2009). Dentre estas características, estão diferenças não apenas morfológicas como também fisiológicas, como: o aumento do número de vacúolos (SHAMSUDDIN *et al.*, 1992), uma maior fragilidade de sua zona pelúcida (DUBY *et al.*, 1997), uma menor compactação embrionária (VAN SOOM *et al.*, 1992), um menor número de blastômeros, sobre o total de massa celular interna (IWASAKI *et al.*, 1990; RIZOS *et al.*, 2002), alterações na expressão gênica (NIEMANN & WRENZYCKI, 2000; LAZZARI *et al.*, 2002; RIZOS *et al.*, 2003; LONERGAN *et al.*, 2003), uma maior incidência de apoptoses (POMAR *et al.*, 2005) e um aumento no conteúdo citoplasmático de lipídeos (MASSIP *et al.*, 1995). Por estas razões e em especial pela última, o congelamento tradicional irá diminuir consideravelmente as taxas de viabilidade nestes tipos de embriões (PEREIRA & MARQUES, 2008). O aumento no tempo de exposição, devido à diminuição gradativa da temperatura durante o congelamento, faz com que o embrião permaneça um maior tempo na faixa de temperatura termotrófica de transição dos lipídeos, afetando-os consideravelmente (ZERON *et al.*, 1999).

Além disso, a vitrificação é uma técnica com outras vantagens frente ao congelamento tradicional, utilizando equipamentos de baixo custo e com procedimentos simples (BARIL *et al.*, 2001).

4.4 Vitrificação

Embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis às lesões provocadas pela criopreservação. Essa sensibilidade é afetada pela qualidade embrionária e reflete-se bioquimicamente (KHURANA & NIEMANN, 2000). A redução na atividade metabólica e na sobrevivência à criopreservação indica a baixa tolerância dos embriões produzidos *in vitro* quando são submetidos a procedimentos de criopreservação (LEIBO & LOSKUTOFF, 1993; NIEMANN, 1995; POLLARD & LEIBO, 1993; POLLARD & LEIBO, 1994; AGCA *et al.*, 1998). Esses obstáculos ainda não tornaram possível o desenvol-

vimento e a consolidação de uma metodologia de criopreservação capaz de propiciar a sobrevivência *in vitro* e *in vivo* desses embriões em níveis satisfatórios.

Com os baixos resultados apresentados pelos métodos tradicionais de crioconservação, na tentativa de preservar embriões provenientes da produção *in vitro*, a vitrificação vem sendo a melhor opção para suplantar esta dificuldade.

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 observadas comumente no processo de vitrificação de embriões, devido à necessidade do uso de altas concentrações de crioprotetores. O grau de toxicidade das soluções crioprotetoras irá 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.

4.4.1 Método OPS – Open Pulled Straw

A técnica de vitrificação denominada Open Pulled Straw (OPS) foi desenvolvida por Vajta *et al.* (1997), originalmente para embriões de bovinos e suínos.

Nesta técnica, os tampões de algodão das palhetas francesas de inseminação de 0,25mL são removidos e estas são amolecidas por aquecimento em sua região central e esticadas manualmente até que o diâmetro interno e a espessura da parede diminuam para aproximadamente metade do tamanho original. As palhetas são subsequentemente resfriadas em ar e cortadas em duas na extremidade estreita. O envasamento dos embriões é realizado utilizando o efeito capilar simples. Cerca de 1 a 2 μ L do meio de vitrificação contendo o embrião é introduzido na extremidade estreita da palheta, a qual é imediatamente submersa no nitrogênio líquido. A coluna líquida solidifica-se imediatamente, sem que haja a dispersão da solução, o que é comum quando são utilizadas palhetas de tamanho original (VAJTA *et al.*, 1998).

O aquecimento é realizado pela colocação da ponta aberta diretamente na placa contendo o meio aquecido. O meio vitrificado volta ao estado líquido dentro de 1 a 2 segundos. Imediatamente após, o embrião flutua no meio de aquecimento (VAJTA *et al.*, 1998).

Neste método a taxa de resfriamento é de 20000°C/min (KULESHOVA & LOPATA, 2002). As razões para a diferença nas taxas de resfriamento entre este método e o convencional (palhetas de 0,25mL) são a redução do volume das soluções, o contato direto entre a solução e o material resfriado ou aquecido e a diminuição da espessura da parede (aproximadamente 0,07mm e 0,15mm para a palheta estendida e original, respectivamente). As conseqüências dessas diferenças foram benéficas para a criopre-

servação de embriões. As altas taxas de resfriamento e aquecimento resultaram em diminuição de danos causados pela crioconservação. Adicionalmente, as grandes velocidades de alteração de temperatura permite o uso de uma concentração menor de crioprotetores o que, junto com o rápido envase e liberação das estruturas, minimiza as injúrias tóxicas e osmóticas. Além disso, o manejo e armazenamento das palhetas são simples, fáceis e não requerem equipamentos especiais (VAJTA *et al.*, 1998).

Uma desvantagem do método OPS é o risco de contaminação, pois o meio possuindo os embriões fica diretamente em contato com o nitrogênio líquido. Porém, esse risco também está presente usando-se palhetas originais, pois a superfície externa a qual é ocasionalmente submersa no meio de diluição é considerado contaminado, podendo carrear patógenos para o interior da palheta. Apesar da dificuldade operacional, risco pode ser diminuído filtrando-se o nitrogênio líquido comercialmente produzido através de um filtro de 0,2 μ L e acondicionado a OPS dentro de palhetas de 0,5mL pré-resfriadas, fechando-se ambas as pontas (VAJTA *et al.*, 1998; KULESHOVA & LOPATA, 2002).

4.4.2 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.* (2000), uma redução na probabilidade de ocorrência da desvitrificação e recristalização durante o aquecimento.

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°C está baseado na diminuição da pressão do recipiente onde está contido o nitrogênio líquido, provocando uma redução do ponto de fusão do nitrogênio líquido, evitando a ebulição do mesmo. Esta condição impede a sublimação do gás ao redor da amostra, acelerando as velocidades de resfriamento.

5. CONCLUSÃO

O grau de aproveitamento dos embriões criopreservados e aquecidos depende de técnicas de tratamento que não produzam danos que os inviabilizem. Verifica-se, no entanto, que quando o manejo requer que os embriões bovinos sejam criopreservados antes da transferência para as receptoras, as técnicas correntes de criopreservação sempre causam perdas de viabilidade.

Os protocolos de crioconservação de embriões produzidos *in vivo* apresentam taxas de sobrevivência satisfatórias, com procedimentos e protocolos já consolidados. No entanto, os embriões produzidos *in vitro* ainda sofrem danos no processo de criopreservação, muitas vezes inviabilizando a produção comercial destes.

A produção *in vitro* de embriões bovinos a partir de ovócitos imaturos tem se tornado um procedimento de rotina para pesquisas em transgênese, clonagem e outras áreas da biologia reprodutiva. Esta técnica tem crescido consideravelmente em aplicações comerciais em programas de criação de bovinos. Para que possa haver maior flexibilidade para uma utilização eficiente e mais difundida desta tecnologia é essencial que os embriões possam ser estocados de forma eficaz em nitrogênio líquido.

Recentes avanços na criopreservação de ovócitos e embriões de mamíferos tem se direcionado quase exclusivamente nas técnicas de vitrificação. Em um futuro próximo, com a padronização de técnicas e protocolos, a vitrificação poderá substituir os métodos tradicionais de crioconservação, oferecendo novas perspectivas para a embriologia comercial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; HARA, K.; MATSUMOTO, H.; *et al.* Feasibility of a nylon mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. **Biology of Reproduction**. Champaign. V. 72, p. 1416-1420, 2005.

AGCA, Y.; MONSON, R.L.; NORTHEY, D.L.; ABAS MAZNI, O.; SCHAEFER, D.M.; RUTLEDGE, J.J. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. **Theriogenology**, v.50, p.147-162, 1998.

ALLER, J.F.; ALBERIO, R.H.; IOVANNITTI, B.; CABOCEVILA, J. Criopreservación de embriones mamíferos 1ª Parte. Características generales de La congelación. **Revista de Medicina Veterinária**, v.76, n°2, p.132-136, 1995.

ALVARENGA, M.A.; FERNANDES, C.B.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Criopreservation of equine embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35(Supl 3), p. 799-809, 2007.

ARAV, A. Vitrification 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. RUBINSKY, B.; SEREN, E.; ROCHE, J.; BOLAND, M. The role thermal hysteresis proteins during cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 107-112, 1994.

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

ARAV, A.; ZERON, Y.; OCHERETNY, A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 248, 2000.

BARIL, G.; TRALDI, A.L.; COGNIÉY, L.; LEBOEUF, B.; CBECKERS, J.F.; MERMILLIOD, P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**, v. 56, p. 299-305, 2001.

BAUDOT, A.; ALGER, L.; BOUTRON, P. Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**. York. 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, p. 245-251, 2005.

CROWE, J.; CROWE, L.; MOURADIAN, R. Stabilization of biological membranes at low water activities. **Cryobiology**, v.20, p.346-356, 1983.

DINNYES, A.; NEDAMBALE, T.L. Cryopreservation of manipulated embryos: tackling the double jeopardy. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21 p. 45–59, 2009.

DUBY, R.T.; HILL, J L.; O'CALLAGHAN, D.; OVERSTROM, E.W.; BOLAND, M.P. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. **Theriogenology**, v. 47 p. 332, 1997.

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

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.

FRIEDLER, S.; GIUDICE, L.C.; LAMB, E.J. Criopreservation of embryos and ova. **Fertility and Sterility**, v.49, p.743-764, 1988.

HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals**. 4th edition. Lea & Febiger. Philadelphia, 1980.

HAMANO, S.; KOIKEDA, S.; KUWAYAMA, M.; NAGAI, T. Full-term development of in vitro matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. **Theriogenology**, v.38, p.1085-1090, 1992.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43 p. 141–152, 1995.

HASLER J.F.; HURTGEN P.J.; JIN Z.Q.; STOKES J.E. Survival of IVF-derived bovine embryos frozen in glycerol or ethylene glycol. **Theriogenology**, v.48, p.563-579, 1997.

HOCHI, S.; SEMPLE, E.; LEIBO, S. P. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.46 p. 837–847, 1996.

HURTT, A.E. Vitrification of equine and bovine oocytes using open pulled straws. **Dissertation (Master of Science)** – Colorado State University, Colorado, 1999.

IM, K.S.; KANG, J.K.; KIM, H.S. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and pre-incubation before insemination on development capacity of frozen-thawed bovine oocytes. **Theriogenology**, v.47, p.881-891, 1997.

IWASAKI, S.; YOSIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in-vitro and in-vivo. **J Reprod Fertil**, v. 90 p. 279-284, 1990.

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, p. 1127–1134, 2001.

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.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Theriogenology**, v.54, p.313-326, 2000.

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

LANDIM E ALVARENGA, F.C. Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões eqüinos.. **Tese (Doutorado)** – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p. 102, 1995.

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biol. Reprod.**, v. 67 p. 767–775, 2002.

LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: DANIEL Jr., J.C. (Ed.) **Methods in mammalian Reproduction**, New York: Academic Press, p. 179-201, 1978.

LEIBO, S.P.; LOSKUTOFF, N.M. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.81-94, 1993

LEIBO S.P.; MARTINO A.; KOBAYASHI S.; POLLARD J.W. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. **Anim. Reprod. Sci.**, v.42, p.45-53, 1996.

LONERGAN, P. *et al.* Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Biol. Reprod.**, v.69 p. 1424–31, 2003.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod.**, v.54, p.1059-1069, 1996.

MASSIP, A; MERMILLOD, P; DINNYES, A. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 10, p. 3004–3011, 1995.

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, p. 939-949, 1970.

NIEMANN, H. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived *in vitro* and *in vivo*. In: international symposium of società italiana per il progresso della zootecnica, 30., 1995, Milan, Italy. 1995, **Proceedings...** 1995. p.117-128.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

NIEMANN, H; WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: implications for subsequent development. **Theriogenology**, p. 53 v. 21-34, 2000.

OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; KONDO, S.; SUZUKI, T. Development capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants. **Theriogenology**, v.40, p.801-807, 1993.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; SUZUKI, T. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. **Cryobiology**, v.32, p.455-460, 1995.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHOKAWA, S.; SUZUKI, T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. **Cryobiology**, v.37, p.77-85, 1998.

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

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine *in vitro* matured oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.173, 1999.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**. Los Altos. V. 54, p. 651-658, 2000.

PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, v. 9 p. 267-77, 2008.

PICKETT B.W. Principles of cryopreservation. In: Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings, 4, 1986, Fort Collins. **Proceeding**: Fort Collins: USA, 1986.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Comparative cryobiology of *in vitro* and *in vivo* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, n.1, p.287, 1993. (Abstract)

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v.41, p.101-106, 1994.

POMAR, F.J.; TEERDS, K.J.; KIDSON, A.; COLENBRANDER, B.; THARASANIT, T.; AGUILAR, B. Differences in the incidence of apoptosis between *in vivo* and *in vitro* produced blastocysts of farm animal species: a comparative study, **Theriogenology**, v. 63 p. 2254–2268, 2005.

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

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

RIZOS, D.; FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 62 p. 320-327, 2002.

RIZOS, *et al.* Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biol. Reprod.**, v. 68 p. 236-243, 2003.

RODRIGUES, J.L. Aspectos da congelação de embriões bovinos In: Reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões, n.7., Jaboticabal, 1992. **Anais**, Jaboticabal, p.55-79, 1992.

RODRIGUES, J.L. Effect of pre-equilibration in 1.5 or 3.6M Ethylene glycol on the survival of day-7 IVMFC bovine blastocysts vitrified in EFS solution. **Theriogenology**, v. 45 p. 168, 1996.

SAITO N.; IMAI K.; TOMIZAWA M. Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. **Theriogenology**, v.41, p.1053-1060, 1994.

SCHNEIDER, V; MAZUR, P; Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, v. 21, p. 68-79, 1984.

SEIDEL, G.E. Jr. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings, 6, 1986, Fort Collins. **Proceedings**. Fort Collins:USA, 1986.

SEIDEL, G.E. Jr.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; *et al.* Cryopreservation of equine embryos in 1,2 propanediol. **Equine Veterinary Journal**. Suppl. 8, p.87-88, aug, 1989.

SEIDEL, G.E. Jr. Cryopreservation of equine embryos. **Veterinary Clinics Of North America: Equine Pract.**, v.12, n.1, p.85-99, april 1996.

SHAMSUDDIN, M; LARSSON, B; GUSTAFFSON, H; GUSTARI, S; BARTOLOME, J; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparative morphological evaluation of in vitro and in vitro produced bovine embryos. **International Congress on Animal Reproduction**, v. 3, p. 1333-35, 1992.

STOREY K.B., STOREY J.M. Frozen and Alive. **Sci. Am.**, December, p.62-67, 1990.

TAKEDA T.; ELSDEN R.P.; DEIDEL Jr. G.E. Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. **Theriogenology**, v.21, p.266, 1984.

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

VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. 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. 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 programable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, p.779-796, 2006.

VAN SOOM, A; VAN VLAENDEREN, I; MAHMOUDZADEH, A.R; DELUYKER, H; KRUIF, A. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. **Theriogenology**, v. 38 p. 905-919, 1992.

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.

VOLKEL, S.A; HU, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 37, p. 23–37, 1992.

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, p. 1071-1079, 1972.

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.

WHITTINGHAM, D.G. Principles of embryo preservation. In: ASHWOOD-SMITH M.J.; FARRANT J. (Eds). **Low temperature in medicine and biology**, Tumbridge Wells: Pitman Medical, p.65-83, 1980.

WOWK, B.; LEITL, E.; RASCH, C.M.; MESBAH-KARIMI, N.; HARRIS, S.B.; M. FAHY, G.M. Vitrification Enhancement by Synthetic Ice Blocking Agents. **Cryobiology**, v. 40, p. 228-236, 2000.

YOUNG, E.; KENNY, A.; PUIGDOMENECH, E.; VAN THILLO, G.; TIVERON, G.; PIAZZA, A. Human oocyte cryopreservation and pregnancy. **Fertil. Steril. Suppl.**, 70:S16, 1998.

ZERON, Y.; PEARL, M.; BOROCHOV, A.; ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 35–42, 1999.