

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

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS EM  
MICROCAPILARES DE QUARTZO

Autora: Zilah Maria Gervasio Cheuiche  
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

2010

ZILAH MARIA GERVASIO CHEUCHE

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS  
EM  
MICROCAPILARES DE QUARTZO.

Aprovada em

APROVADO POR:

---

Prof. Dr.  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr.  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr.  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr.  
Membro da Comissão

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor José Luiz Rodrigues, agradeço de coração pela oportunidade de realizar o mestrado, pela paciência e preciosos ensinamentos compartilhados ao longo do curso.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS e seu corpo docente por contribuir para minha formação pós-acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos pós-graduandos Daniela Scherer, Andrea Galuppo, Natália Arruda e Carlos Alberto Brigoni. Aos bolsistas de iniciação científica Rafael Ruggeri, Lis Marques, Letícia Arruda, Otávio Sicco e Rafael Navarro e também aos funcionários João Roberto e Dona Leda. O auxílio prático, a amizade e companheirismo foram fundamentais para a realização do projeto.

Em especial e com todo o amor aos meus pais Alcy e Maria Berenice. Meus grandes incentivadores e para quem eu especialmente dedico este trabalho.

“O conhecimento unido à serenidade se transforma em sabedoria”

Lin Yutang

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	11
<b>2.1</b>	<b>Vitrificação</b> .....	12
<b>2.1.1</b>	<b>Crioprotetores</b> .....	15
<b>2.1.2</b>	<b>Métodos de envase</b> .....	22
<b>2.1.2.1</b>	Microcapilares de vidro .....	24
<b>2.1.2.2</b>	Microcapilares de quartzo.....	26
<b>3</b>	<b>Artigo</b> .....	27
<b>3.1</b>	Vitrificação de embriões <i>Mus domesticus domesticus</i> envasados em microcapilares de quartzo.....	27
	Resumo.....	28
	Introdução.....	30
	Materiais e Métodos.....	32
	<i>Produção de embriões murinos</i> .....	32
	Características da QMC e preparação das GMP.....	33
	<i>Procedimento de vitrificação</i> .....	34
	<i>Procedimento de reaquecimento</i> .....	34
	<i>Observação do desenvolvimento in vitro</i> .....	34
	Análise Estatística.....	34
	Resultados.....	35
	Discussão.....	37
	Conclusão.....	39
	Referências Bibliográficas.....	40
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	44
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	45
<b>6</b>	<b>ANEXOS</b> .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$	microlitro(s)
$\mu\text{m}$	micrômetro
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
bl	blastocisto
be	blastocisto eclodido
bi	blastocisto inicial
bx	blastocisto expandido
BSA	albumina sérica bovina (bovine serum albumin)
DMSO	dimetilsulfóxido
eCG	gonadotrofina coriônica equina
EG	etilenoglicol
GLY	glicerol
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
mg	miligramas
min	min
mL	mililitro (s)
mm	milímetro (s)
N	número
NL <sub>2</sub>	nitrogênio líquido
O <sub>2</sub>	oxigênio
OPS	palhetas esticadas abertas (open pulled straw)
mPBS	solução salina fosfatada tamponada modificada
pH	potencial hidrogeniônico
PM	peso molecular

PROH	1,2-propanediol
PVA	álcool polivinílico
PVP	polivinil-pirrolidone
QMC	micropipeta de quartzo
SE	solução equilíbrio
SD	solução de desidratação
SFB	soro fetal bovino
SV	solução de vitrificação
seg	Seg
SNL <sub>2</sub>	nitrogênio líquido ultra-resfriado
TE	transferência de embrião(ões)
UI	unidade internacional
SV	solução de vitrificação
v/v	volume/volume
W/(m.K)	Watt por metro por Kelvin
w/v	peso/volume

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Eclosão dos blastocistos vitrificados e envasados em QMC ou GMP, expostos a duas soluções crioprotetoras diferentes (7 repetições).....35

**Tabela 2** - Taxas de eclosão dos blastocistos murinos vitrificados e envasados em QMC de dois diâmetros diferentes (5 repetições).....35



## 1. Introdução

Em criobiologia, o termo vitrificação é utilizado para métodos de criopreservação nos quais a totalidade da amostra permanece em estado sólido amorfo (“vítreo”) após seu rápido resfriamento. A vitrificação pode ser definida como a solidificação de um líquido, produzida não pela cristalização, mas por uma extrema elevação na viscosidade durante o resfriamento (FAHY *et al.*, 1984). A idéia de conservar material biológico em estado vítreo é creditada a Luyet (1937). O autor obteve vitrificação resfriando rapidamente pequenas amostras, evitando o processo de formação de gelo, em soluções sem a presença de crioprotetor. Na reprodução animal os crioprotetores foram utilizados apenas anos mais tarde para congelamento de sêmen (POLGE *et al.*, 1949).

A habilidade de manter viáveis oócitos e embriões de mamíferos em baixas temperaturas por longos períodos tem um papel de importância em biotecnologia. Ao longo de 25 anos, a técnica de vitrificação se desenvolveu de maneira significativa, tornando-se uma ferramenta alternativa para a manutenção de recursos genéticos de animais domésticos e silvestres (SANTIN *et al.*, 2009). Mais recentemente, também vem sendo empregada para preservação de células-tronco destinadas à medicina regenerativa e à reprodução assistida humana (HE *et al.*, 2008).

Os primeiros trabalhos realizados em criopreservação de embriões são de autoria de Whittingham *et al.* (1972) e Wilmut (1972), que, separadamente, descreveram que embriões murídeos podiam ser congelados e estocados em N<sub>2</sub>L. Rall e Fahy (1985) foram os primeiros a utilizar com sucesso o processo de vitrificação para a criopreservação de embriões mamíferos, igualmente em experimentos realizados com camundongos. Desde então, a vitrificação tem se mostrado uma técnica simples, rápida e econômica para a criopreservação de embriões de diversas espécies animais.

No Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, são realizados experimentos em vitrificação de embriões murinos desde 1987. Lopes e Rodrigues (1988) vitrificaram

embriões de camundongos (mo, bl e bx) obtendo taxas de sobrevivência *in vivo* de 27,5% (22/80), 13,75% (11/80), 5% (4/80).

Em um trabalho realizado no mesmo laboratório, Lopes e Rodrigues (1991) vitrificaram embriões murinos utilizando a associação dos crioprotetores GLY (25%) e PROH (25%). Após a transferência para fêmeas receptoras, os embriões em estágio de mo, bi e bl produziram taxas de implantação de 47% (22/47), 37% (11/30) e 19% (4/21), respectivamente. Posteriormente, outros experimentos foram realizados procurando ajustar os crioprotetores e tipos de envase, otimizando a sobrevivência embrionária (ANDRADE e RODRIGUES, 1987; PALHA, LOPES e RODRIGUES, 1991; HOTZEL e RODRIGUES, 1992; AGUIAR, 1997; CÔRTEZ e RODRIGUES, 2000; BERTOLINI *et al.*, 2005; ASSAF, 2007; COSTA., 2007).

Mais recentemente, em um trabalho realizado no mesmo laboratório, Vieira *et al.* (2007), adotaram capliares de vidro (GMP) como envase de embriões bovinos para a vitrificação utilizando microvolumes de crioprotetor associado a exposição ao nitrogênio superresfriado (-200 °C), que proporcionou um aumento nas taxas de resfriamento. Nivia *et al.* (2008) realizou a comparação entre o envase de bl murinos para vitrificação em GMP (microvolume) com o envase em palhetas com uma haste de ouro (macrovolume). Os resultados revelaram que a vitrificação dos embriões após prévia desidratação (3 min em SV), 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).

O objetivo do experimento foi determinar as taxas de sobrevivência pós vitrificação de blastocistos murinos expostos a duas associações de crioprotetores e envasados em micropipetas de quartzo (QMC) de dois diâmetros diferentes.

## 2. Revisão Bibliográfica

O frio retarda as reações enzimáticas, interferindo no metabolismo celular. Assim, baixando-se a temperatura de um sistema biológico é possível frear o metabolismo das células e obter a conservação do material (COURBIÈRE *et al.*, 2009).

A criopreservação de oócitos e embriões é uma ferramenta útil na difusão de diversas técnicas aplicadas à embriologia (VAJTA e KUWAYAMA, 2006). Os protocolos devem ser ajustados considerando que as condições ideais de vitrificação variam conforme as espécies, devido às características de tamanho e superfície do embrião, propriedades da membrana celular e sensibilidade ao crioprotetor (KASAI, 1996), além do estágio de desenvolvimento embrionário e origem (*in vivo* ou *in vitro*) (LEIBO *et al.*, 1995). A maior parte destas diferenças deve-se a quantidade de moléculas de lipídio no meio intracelular, às diferentes estruturas microtubulares, assim como à razão volume/superfície do embrião (VAJTA *et al.*, 1998). De acordo com Vajta e Nagy (2006), no caso de oócitos, a baixa relação superfície/volume pode influenciar negativamente a penetração dos agentes crioprotetores, embora as características de permeabilidade de uma célula estejam principalmente relacionadas às propriedades da membrana celular. Ainda segundo os autores, geralmente, oócitos e embriões nos estágios iniciais de desenvolvimento são mais sensíveis aos efeitos nocivos da criopreservação. Entretanto, de acordo com Vanderzwalmen *et al.* (2000), em blastocistos, o tamanho da blastocèle altera a quantidade de crioprotetor permeada através das células embrionárias.

Segundo Kasai (2002), para alguns tipos de embriões murídeos, humanos (2-8 células) e bovinos (bl); métodos confiáveis de criopreservação foram estabelecidos e são usados como rotina. No entanto, embriões PIV são mais sensíveis à criopreservação do que embriões coletados *in vivo* (KHURANA e NIEMANN, 2000). Segundo Leibo *et al.* (1995), embriões PIV

possuem menor compactação das mórulas e maior quantidade de lipídio do que os produzidos *in vivo*.

## 2.1 Vitrificação

Após 25 anos da primeira aplicação satisfatória da vitrificação (RALL e FAHY, 1985), tornou-se um método aplicável na criopreservação de embriões de diversas espécies. Também tem sido utilizada em reprodução assistida humana para a crioconservação de blastocistos em número excedente (KADER *et al.*, 2009).

A vitrificação pode ser definida como o processo no qual um líquido solidifica sem cristalização (Luyet, 1937). O fenômeno físico que ocorre é a passagem do estado líquido para o sólido amorfo através do resfriamento e, também, de acordo com Vajta (2010) pode ser definido por um aumento extremo na viscosidade dos líquidos à temperatura abaixo do ponto de congelamento. No processo de congelamento as moléculas se movimentam criando os chamados cristais de gelo. Já na vitrificação, a alta viscosidade da solução impede a movimentação molecular, proporcionando a solidificação em estado vítreo, sem a presença de cristalização (WOWK, 2009). Assim sendo, a vitrificação evita a formação de gelo pelo uso de altas velocidades de resfriamento e reaquecimento, sendo favorecida pelo uso de altas concentrações de crioprotetor (VAJTA *et al.*, 1998). As osmolaridades das soluções de desidratação (SD) e de vitrificação (SV) substituem parte da água da célula permitindo que no momento de sua subsequente exposição (a temperatura acima de zero) ao  $NL_2$  rapidamente se torne vítrea, de modo que o restante do líquido intracelular não tem tempo para formar cristais de gelo. Uma situação diferente do processo de congelamento onde processo de desidratação celular é lento durante o resfriamento e quando da imersão da amostra (a temperaturas abaixo de zero) em  $NL_2$  ocorre cristalização da água remanescente (STACHECKI *et al.*, 2008).

A técnica de vitrificação revelou alguns benefícios quando comparada ao congelamento convencional. Não há exigências de equipamentos, e a exposição das amostras ao  $NL_2$  pode ser feita de maneira eficiente em uma pequena caixa de isopor (VAJTA, 2010). Nedambale *et al.* (2004) compararam as taxas de sobrevivência pós reaquecimento de bl bovinos PIV, cultivados em meio KSOM e SOF, criopreservados através de congelamento ou vitrificação. Para o congelamento, foi empregado meio contendo GLY (1,36M), obtendo-se uma taxa de eclosão de 31% após 48h de cultivo. No procedimento de vitrificação foi utilizado meio contendo GLY (6,5M), obtendo-se 60% de eclosão após 48 h de cultivo.

Em outro trabalho desenvolvido recentemente, El-Gayar *et al.* (2011a) blastocistos caprinos coletados *in vivo* foram criopreservados através de congelamento ou vitrificação. Os embriões submetidos à vitrificação em OPS, foram expostos à SD contendo DMSO (10%) e EG (10%) por 1 min seguido da exposição por 20 seg à SV, contendo o dobro da concentração da SD. Os embriões submetidos ao congelamento foram equilibrados em meio de cultivo M2 que continha GLY (1,4M) envasados em palhetas francesas de 0,25mL e congelados à velocidade de 0,3°C min. Após o reaquecimento, dois embriões foram transferidos para cada fêmeas receptora sincronizada. Os resultados de prenhez observados foram de 67% (17/25) das receptoras no grupo que recebeu embriões vitrificados e 42% (10/22) nas receptoras que receberam os embriões congelados.

As principais desvantagens relacionadas à vitrificação são o estresse osmótico e a toxicidade causada pela solução crioprotetora, os quais causam danos às células embrionárias (PAPADOPOULOS *et al.*, 2002). Também pode ocorrer fratura de zona pelúcida e de citoesqueleto, além de alterações nas organelas (KASAI, 1996; MASSIP, 2001).

Vajta e Nagy (2006) destacam que todos os oócitos e embriões sofrem danos consideráveis durante o resfriamento e reaquecimento, entretanto, estas estruturas possuem capacidade de reparar parcial ou totalmente os danos,

possibilitando a retomada do desenvolvimento.

No congelamento convencional é possível utilizar baixas concentrações de crioprotetor reduzindo sua toxicidade às células embrionárias. Entretanto, apesar da menor toxicidade a técnica congelamento é associada a danos celulares provocados pela formação de cristais de gelo. Por outro lado, para se obter vitrificação é necessário que se utilize altas concentrações da solução crioprotetora (4 a 8 M), o que torna a toxicidade para as células um problema.

É possível minimizar a toxicidade da SV às células, são empregadas rápidas taxas de resfriamento responsáveis pela redução da toxicidade dos crioprotetores e diminuem o tempo de exposição da célula às temperaturas que irão causar lesão (ARAV *et al.*, 1992; VAJTA *et al.*, 1998). O aumento da velocidade da curva reduz as lesões decorrentes do resfriamento da porção lipídica das membranas celulares e do citoesqueleto, por passar rapidamente pelas zonas térmicas críticas (DOBRINSKY, 1996; MARTINO *et al.*, 1996).

Segundo Vajta and Kuwayama (2006), o volume da amostra é um fator chave para o sucesso da técnica de vitrificação. Minimizar o volume da amostra diminui a probabilidade da formação de cristais de gelo e, conseqüentemente, facilita a vitrificação (ARAV *et al.*, 2002; YAVIN e ARAV, 2007). De acordo com Risco *et al.* (2007) quanto menor o volume da amostra, maior velocidade da curva, exigindo menores concentrações de crioprotetor. O uso de pequenos volumes de solução aumenta a transferência de calor minimizando o tempo de resfriamento e reaquecimento (KADER *et al.*, 2009).

Mazur (1970) destacou que as lesões osmóticas são causadas pelas alterações do volume celular durante os processos de adição e retiradas dos crioprotetores. A retirada dos crioprotetores em meio isotônico leva a uma passagem das soluções muito rápida através das membranas, causando danos celulares. Para que as trocas sejam mais lentas, podem-se empregar soluções hipersaturadas no reaquecimento, como por exemplo, a sacarose (KASAI e MUKAIDA, 2004). Outra alternativa para evitar o choque osmótico consiste em

expor os embriões a menores concentrações gradativamente até a retirada total do crioprotetor (KULESHOVA *et al.*, 2001).

Fahy (2007) descreveu os tipos de efeitos tóxicos dos crioprotetores sobre as células embrionárias. Um deles se refere à toxicidade específica de cada crioprotetor. Os efeitos químicos observados foram a destruição das estruturas celulares como o citoesqueleto, membranas e organelas. Outro efeito é a toxicidade indireta causada por alterações na localização da água nas moléculas hidratadas, além da desnaturação das proteínas.

Recentemente foram realizados com sucesso experimentos em vitrificação para a crioconservação de embriões e oócitos de diversas espécies animais de interesse econômico, tais como suínos (MACEDO *et al.*, 2010), ovinos (SHIRAZI *et al.*, 2010), bovinos (RÍOS *et al.*, 2010), bubalinos (MANJUNATHA *et al.*, 2009) e equinos (CAMPOS-CHILLÒN *et al.*, 2009). Em um trabalho também recente de Rezazadeh *et al.* (2009), foi comparada a eficiência da vitrificação versus o método de congelamento lento na criopreservação de blastocistos humanos. A taxa de sobrevivência dos embriões criopreservados através da vitrificação foi maior do que a obtida através de congelamento convencional, proporcionando porcentagens de gravidez de 40,5% (62/153) vs. 21,4% (32/152), respectivamente.

## **2.2 Crioprotetores**

Os crioprotetores são compostos químicos naturais ou sintéticos que tem função de proteger as células dos efeitos deletérios das baixas temperaturas (BAUDOT e ODAGESCU, 2004). Rall e Fahy (1985) realizaram a vitrificação de embriões murídeos utilizando a primeira solução crioprotetora com a associação de três crioprotetores intracelulares (DMSO, acetamida e PROH) e uma macromolécula, o polietileno-glicol. A taxa de sobrevivência foi de 87,8% (301/343). Ishimori *et al.* (1992) vitrificaram mo e bl utilizando seis diferentes

misturas de crioprotetores intracelulares, na concentração de 25%: 1) GLY + EG; 2) GLY + PROH; 3) GLY + DMSO; 4) EG + PROH; 5) EG + DMSO e 6) PROH + DMSO. As taxas de eclosão das mórulas foram, 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), respectivamente. Já as taxas de eclosão dos bl foram de 72% (61/85), 29% (25/85), 55% (47/85), 46% (39/84), 79% (70/89) e 46% (41/89), respectivamente. A análise estatística revelou maiores taxas de sobrevivência dos embriões expostos à associação de GLY + DMSO e EG + DMSO.

Vajta (2010) relata que a vitrificação dos líquidos não é comum na natureza, porém existem proteínas anticongelantes que protegem animais e plantas polares a baixíssimas temperaturas. As células destes animais desidratam para que aumente a concentração endógena de crioprotetores que agirão evitando a cristalização intracelular. Certos animais poiquilotérmicos como tartarugas e lagartos são capazes de sobreviver em temperaturas abaixo do ponto de congelamento dos seus líquidos corporais. Esta sobrevivência também se deve à síntese de substâncias antigelo além do glicerol, glicose, sorbitol e glicoproteínas (RUBRINSKY *et al.*, 1992). Segundo os autores, estas substâncias antigelo regulam os processos de cristalização. A conservação de sistemas biológicos necessita do uso de crioprotetores que limitem a taxa de cristalização e as consequências letais do resfriamento.

Dobrinsky (1996) ressaltou que entre as funções dos crioprotetores, a principal é remover e/ou substituir o líquido celular. De acordo com Seidel (2006), estas substâncias promovem a desidratação celular, reduzindo, no caso da congelação, a formação de cristais de gelo intracelulares. Ao mesmo tempo têm uma ação estabilizadora sobre a membrana celular, durante os procedimentos de resfriamento e aquecimento do sistema. Já foi também relatado que alguns crioprotetores como o DMSO, por exemplo, podem inibir a atividade da catalase e da peroxidase, diminuindo a produção de radicais livres envolvidos nos danos causados pelo congelamento (VAJTA, 2000).



Os crioprotetores intracelulares são substâncias orgânicas bastante solúveis e de baixo PM. Holt (2000) citou o EG, o DMSO, o GLY e o PROH como os crioprotetores intracelulares mais utilizados. O DMSO tem PM 78 e é rapidamente permeável através das membranas (BAUDOT *et al.*, 2000). O PROH tem PM 76 e grande estabilidade em estado amorfo, o EG é um diálcool com PM 62 e rápida capacidade de difusão (LIEBERMANN *et al.*, 2002; BAUDOT e ODAGESCU, 2004; COURBIÈRE *et al.*, 2009). De acordo com Holt (2000), o grau de desidratação é regulado pela osmolaridade da solução crioprotetora, que deve evitar uma excessiva concentração de solutos impedindo a ocorrência do denominado “efeito de solução” (Mazur, 1990), evitando-se danos sobre as células embrionárias.

Segundo Santin *et al.* (2009), tanto os crioprotetores permeáveis quanto os não permeáveis reagem com os fosfolípidos presentes na membrana celular e ficam ligados a eles durante todo o processo. Esta reação confere uma maior estabilidade à membrana. O embrião retrai quando exposto a um crioprotetor intracelular devido a perda de água causada pela hiperosmolaridade inicial do meio extracelular, e ainda, porque a membrana plasmática dos blastômeros é mais permeável a saída de água do que a entrada do crioprotetor. A velocidade de entrada do crioprotetor no embrião depende do coeficiente de permeabilidade e da temperatura da solução.

Os crioprotetores extracelulares são açúcares ou polímeros de alto peso molecular que aumentam a viscosidade das soluções de vitrificação. São com frequência associados aos crioprotetores intracelulares (LIEBERMANN *et al.*, 2002; KULESHOVA e LOPATA, 2002). Eles se ligam fortemente às moléculas de água, diminuindo sua velocidade e aumentando a viscosidade da solução e, conseqüentemente, diminuindo a taxa de cristalização. Pela sua grande afinidade com a água, os crioprotetores impedem os processos de nucleação do gelo (COURBIÈRE *et al.*, 2009). Os açúcares também podem reduzir a toxicidade química dos crioprotetores sobre a membrana celular por formarem ligações de hidrogênio com os fosfolípidos presentes nestas membranas

(ANCHORDOGUY *et al.*, 1987). O grupo é composto por macromoléculas e açúcares. Os mais utilizados são a lactose, glicose, sacarose, manitol, trealose, entre outros (NIEMANN, 1991).

A adição de polímeros de alto peso molecular aumenta a viscosidade das soluções de vitrificação. Estes polímeros permitem que se reduza a concentração de crioprotetor e, portanto, a toxicidade. Também protegem os oócitos e embriões de forma mecânica, mantendo-os em uma cápsula viscosa que impede a cristalização (COURBIÈRE *et al.*, 2009). Os polímeros como a polivinil pirrolidona, polietilenoglicol e PVA também são usados para prevenir a adesão dos embriões à superfície do vidro ou plástico durante a manipulação ou cultivo (ASADA *et al.*, 2002). Os autores vitrificaram oócitos bovinos após a maturação *in vitro* utilizando meios com três diferentes concentrações de PVA (0,05, 0,1, 0,5 ou 1%), meio acrescido de 20% SFB e meio sem fonte protéica. Após o reaquecimento e cultivo, as taxas de clivagem obtidas utilizando concentrações de 0,1 e 0,5% de PVA foram de 18,8% e 17,9%, respectivamente, não diferindo da taxa de clivagem obtida com o meio adicionado de SFB (18,6%). Os autores justificam o uso do PVA por este ser quimicamente definido e proporcionar maior segurança sanitária em relação ao SFB.

De acordo com Yavin *et al.* (2009), os crioprotetores tendem a ser tóxicos quando usados em altas concentrações como as exigidas para a vitrificação. O EG faz parte da maioria dos protocolos atuais (VAJTA e NAGY, 2006). Sabendo-se que a toxicidade e a alta velocidade das trocas osmóticas são danosas às células embrionárias, é crucial restringir a concentração dos crioprotetores. Uma forma de reduzir esta concentração consiste em aumentar a velocidade da curva de resfriamento mediante a redução do volume da amostra (Arav *et al.*, 1992; Yavin e Arav, 2007).

Considerando todas as variáveis, diversas estratégias têm sido utilizadas para minimizar os danos tóxicos e osmóticos causados pelos processos de vitrificação e reaquecimento, como o uso de crioprotetores menos tóxicos,

combinações e diferentes soluções de aquecimento (SANTIN *et al.*, 2009). Segundo Vajta e Nagy (2006), uma abordagem pode ser o uso combinado de dois ou três crioprotetores com o objetivo de reduzir a toxicidade individual. Um deve obrigatoriamente ser permeável, e pode-se combinar com um impermeável (COURBIÈRE, 2009). Ishimori *et al.* (1992), compararam seis combinações diferentes de crioprotetores na vitrificação de embriões murinos (mo e bl): GLY + EG, GLY + PROH, GLY + DMSO, EG + PROH, EG + DMSO e PROH + DMSO, na concentração de 25% para cada crioprotetor, diluídos em PBSm. As taxas de sobrevivência *in vitro* das mo foram de: 59% (30/51), 62% (10/16), 60% (47/78), 61% (27/44), 63% (50/79) e 60% (30/50), respectivamente. Os embriões vitrificados no estágio de bl revelaram as seguintes taxas de eclosão após o aquecimento e cultivo *in vitro*: 85% (61/72), 85% (25/29), 85% (47/55), 84% (39/46), 89% (70/79) e 89% (41/46), respectivamente. Os resultados mostraram que a associação de DMSO e EG foi a que proporcionou maiores taxas de sobrevivência para as mo e bl murinos.

Rodriguez (2009) avaliou os efeitos da vitrificação em embriões murinos comparando duas combinações de crioprotetores. A primeira, composta por dimetilformamida associada ao EG e a segunda, por EG combinada ao PROH. Os embriões foram expostos às soluções em duas etapas. Na etapa inicial permaneceram durante 1 min na SD e a seguir, durante 30 seg, na SV durante o envase em GMPs. Os resultados de clivagem mais satisfatórios foram obtidos nos grupos da combinação de EG (20%) + PROH (20%) + PVA (0,5%) em PBSm, obtendo uma taxa de eclosão de 70% (73/105).

A exposição dos blastocistos à solução crioprotetora em etapa única aumenta o risco de choque osmótico, principalmente quando a concentração é elevada. Dependendo do tempo de exposição, a etapa única pode conferir tempo insuficiente para a desidratação adequada da blastocele (KADER *et al.*, 2009). Segundo Vajta e Kuwayama (2006), a viabilidade das células embrionárias é preservada se houver restrição da quantidade e da velocidade dos líquidos que atravessam a membrana. A exposição dos embriões às soluções de equilíbrio,

que possuem metade da concentração, confere proteção às células e não prejudicam a integridade dos embriões.

De acordo com Vajta e Nagy (2006) outra estratégia para reduzir a toxicidade das soluções crioprotetoras é a exposição dos embriões às soluções em mais de uma etapa no processo de vitrificação. Geralmente são utilizadas duas etapas de exposição, onde a primeira solução (SD) possui de 20 a 50% de concentração da segunda (SV). Segundo Liebermann *et al.* (2002) o passo inicial da vitrificação consiste em exposição do embrião a concentrações relativamente baixas de crioprotetor, como a formulada em DMSO (7,5%) + EG (7,5%) por 2 a 5 min, seguida de exposição ultra rápida (30 a 90 seg) a um segundo meio contendo o dobro da concentração do primeiro. Liebermann *et al.*, (2002) afirmam que as taxas de sobrevivência após vitrificação são maiores quando se utiliza o processo de duas etapas. Isso permite que os crioprotetores penetrem os blastômeros de forma mais gradual e eficaz. Em um experimento de Mahmoudzadeh *et al.* (1995) foram comparados protocolos de exposição às soluções crioprotetoras em uma ou duas etapas. Os resultados revelaram um aumento significativo nas taxas de sobrevivência de 51% (30/59) para 89% (57/64), respectivamente.

Outra estratégia comum para diminuir a toxicidade das soluções é expor os embriões pelo menor tempo possível a SV, porém, permitindo que haja uma absorção suficiente de crioprotetor, necessária para evitar a formação de cristais de gelo (LIEBERMANN *et al.*, 2002). A temperatura varia de acordo com o procedimento utilizado (KASAI, 1996). Ao reaquecer é aconselhável manter a palheta no ar por alguns seg para evitar danos de fraturas causados pela sublimação do  $NL_2$  que se encontrava junto à solução crioprotetora no interior da palheta (VAJTA e NAGY, 2006).

Após o reaquecimento, a concentração de crioprotetor na solução que contém os embriões é alta. Para evitar a entrada demasiadamente rápida de água na célula, pode-se empregar uma solução que atue como tampão osmótico. Os açúcares de alto peso molecular, tais como a sacarose, auxiliam na retirada do crioprotetor pelo efeito da desidratação que leva uma alta osmolaridade do

meio extracelular. Seu papel principal consiste em proteger as células de um choque osmótico no momento da retirada do crioprotetor intracelular, (ANCHORDOGUY, 1987). Estes açúcares contrabalançam a grande concentração de crioprotetor dentro da célula, tornando as trocas osmóticas mais lentas (LIEBERMANN *et al.*, 2002), mantendo constante a concentração do meio extracelular, regulando a entrada e saída de crioprotetor do embrião (LEIBO, 1984).

De acordo com Cho *et al.* (2002) a curva de reaquecimento é importante e deve ser controlada. Um reaquecimento adequado é tão determinante para o sucesso da técnica quanto a velocidade de resfriamento. (YAVIN e ARAV, 2007). O procedimento de reaquecimento do sistema é realizado transferindo-se imediatamente a amostra para um meio pré-aquecido (37°C), assegurando-se de que esta temperatura estará imediatamente disponível para os embriões. Em sistemas abertos, mistura-se a amostra em meio aquecido. Nos sistemas fechados se realiza um banho da palheta selada em água a 37°C. A diluição do crioprotetor e o colapamento da blastocela correm durante este processo, e por isso é necessário utilizar um meio que permita a troca gradual de líquidos através das membranas, evitando o choque osmótico (CHO *et al.*, 2002). Um protocolo utilizado por Mukaida *et al.* (2006) no reaquecimento de blastocistos humanos emprega três diluições, iniciando-se com um banho em sacarose 0,3M em meio de manipulação, seguido por outro em placa contendo de sacarose 0,2M, finalizando com a transferência dos blastocistos para o meio de manipulação sem sacarose.

Em um trabalho recente desenvolvido por El-Gayar *et al.* (2011b), buscou-se reduzir a concentração dos crioprotetores utilizados na vitrificação de bl murinos empregando a sacarose na SD. Os embriões foram coletados e divididos em quatro grupos. No grupo controle, foi realizada a vitrificação em OPS conforme protocolo proposto por Vajta *et al.* (1998), expondo-os por 1 min a uma SD contendo DMSO (10%) + EG (10%), sendo após expostos a SV por 20 seg, contendo o dobro da concentração da primeira. No segundo grupo, o procedimento anterior foi precedido por uma exposição durante 1 min a uma

solução contendo sacarose 1M. No terceiro grupo, a SD foi substituída pela solução de sacarose. No quarto grupo, foram adicionados de sacarose 0,2M na SD e de sacarose 0,4M na SV. A taxa de eclosão dos blastocistos vitrificados no grupo controle foi de 89%. Já as taxas de sobrevivência observadas nos blastocistos dos grupos 2, 3 e 4 foram as seguintes: 64%, 29% e 88%, respectivamente. Os resultados mostram que a exposição à solução composta por sacarose na desidratação compromete a viabilidade dos embriões, enquanto que a sua adição nas SD e SV não causa efeitos deletérios aos bl vitrificados.

### **2.3 Métodos de envase**

O tipo de envase exerce um papel fundamental em criopreservação. É de grande interesse que se obtenha alta velocidade da curva de resfriamento e, portanto, se deve empregar materiais que preencham o requisito de condutividade térmica (HE *et al.*, 2008). No primeiro experimento realizado em vitrificação de embriões murinos, Rall e Fahy (1985) utilizaram como envase as palhetas francesas de 0,25 ml ou criotubos. Os autores obtiveram velocidade de resfriamento de 2.550°C/min mergulhando as palhetas em NL<sub>2</sub>. A OPS (VAJTA *et al.*, 1998), é uma versão aprimorada da palheta de 0,25 ml, esticada após aquecida, diminuindo assim o diâmetro interno e reduzindo também o volume, de 250 µL para 50 µL. A redução do diâmetro aumenta o efeito de capilaridade, que facilita o envase (VAJTA *et al.*, 1998).

Foram pesquisados outros métodos alternativos que permitiram o contato direto entre a amostra de volume reduzido (embrião ou oócito) com o LN<sub>2</sub>, como por exemplo, as grades de microscopia eletrônica (MARTINO *et al.*, 1996), cryoloop (LANE *et al.*, 1999), cryotop (KUWAYAMA *et al.*, 2005). Zhang *et al.* (2009) vitrificando embriões murídeos de 2, 4 e 8-células utilizando o método cryotop, obtiveram taxas de eclosão satisfatórias (52,6% - 103/196; 60,0% - 126/210; 78,4% - 160/204, respectivamente).

Também foi experimentado o método de vitrificação em microgotas (ARAV e ZERON, 1997; YAVIN e ARAV, 2001), envase em ponteiras para gel de eletroforese (*gel loading tips*) (TOMINAGA e HAMADA, 2001), palhetas superfinas esticadas (*super-finely pulled straw* - SOPS) (ISACHENKO *et al.*, 2003), ponteira de escarificação estéril (*sterile stripper tip*) (KULESHOVA e LOPATA, 2002), pipeta flexível de desnudamento (*flexipet denuding pipette* - FDP) (LIEBERMANN *et al.*, 2002), micropipeta plástica de diâmetro reduzido (*fine diameter plastic micropipette*) (CREMADES, 2004) e a ponteira de pipeta de 100 µL (*100 µL pipetting tip*) (HREDZAK, 2005).

Diversos materiais foram testados para aumentar a curva de congelamento através de sua alta condutividade térmica como as GMP com menor diâmetro interno e paredes finas (BERTOLINI *et al.*, 2005; palheta com haste de ouro (NIVIA, 2008); palhetas metálicas (BUNN *et al.*, 2006). He *et al.* (2008) que utilizaram envase em micropipetas de quartzo, obtiveram uma velocidade de resfriamento de 100.000°C/min. Os autores vitrificaram células tronco de camundongos com uma baixa concentração de crioprotetores (PROH 2M e trealose 0,5M), obtendo uma taxa de viabilidade de 70%.

O inconveniente dos sistemas abertos tais como os citados anteriormente, é o contato direto com o LN<sub>2</sub>, criando o risco de contaminação cruzada. Yu *et al.* (2009) avaliaram a eficiência da vitrificação em palhetas esticadas fechadas (*Closed Pulled Straws* – CPS) na sobrevivência de embriões bovinos PIV e *in vitro*. Os embriões (mo e bl) foram criopreservados através de congelamento convencional, vitrificação com envase em OPS e nas CPS. Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade embrionária após 72 horas de cultivo no envase em OPS 54/153 (35,2%) ou CPS 55/158 (34,9%). Entretanto, os resultados obtidos através das duas técnicas de vitrificação foram mais favoráveis do que através de congelamento convencional 38/155 (24,7%). Os resultados de sobrevivência embrionária foram semelhantes entre os embriões PIV e os *in vivo* e vitrificados em OPS 26/68 (38,2%), em CPS 25/67 (37,2%) e congelados 17/63 (27,5%).

Outros trabalhos também buscaram diminuir o risco de contaminação dos embriões utilizando meia palheta (*hemi-straw system*) (VANDERZWALMEN *et al.*, 2000). LÓPEZ-BÉJAR e LÓPEZ-GATIUS (2002), compararam a eficiência da palheta esticada selada (mOPS) com a palheta francesa de 0,25ml na vitrificação de mórulas de coelhos. As taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de bl foram de 72,6% (273/376) para as mOPS e 68% (235/345) para as palhetas tradicionais.

### **2.3.1 Micropipetas de vidro (GMP)**

A técnica de vitrificação em GMP foi descrita por Cho *et al.* (2002), e teve por objetivo substituir a palheta plástica OPS por uma que não flutuasse em nitrogênio líquido e aumentasse a velocidade de resfriamento devido a condutividade térmica do material. Os autores, comparando os dois envases na vitrificação de bl bovinos PIV, observaram que o diâmetro interno da GMP é de 0,3 mm e da OPS 0,8mm, sendo possível envasar na GMP aproximadamente 0,14 mm<sup>3</sup>, um volume 19 vezes menor que na OPS. As taxas de eclosão dos embriões bovinos não foram diferentes ( $P>0,05$ ) entre os grupos vitrificados em GMP (57,1%) ou OPS (51,8%), entretanto, ambos foram inferiores ( $P<0,05$ ) ao grupo controle (67,3%).

Kong *et al.* (2000), procurando testar um material de maior condutividade térmica, compararam as GMP com as OPS, determinando assim a eficiência entre os dois envases. Foram vitrificados blastocistos murinos em OPS ou nas GMP obtendo-se resultados semelhantes com os dois envases. As taxas de eclosão foram de 88,7% (55/62) e 90,0% (54/60), respectivamente.

Tan *et al.* (2009) relatam que, além da condutividade térmica do vidro, o diâmetro interno e o volume da solução de vitrificação também podem influenciar os resultados de sobrevivência embrionária. Os autores observaram as taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, a partir da



fecundação de oócitos vitrificados e envasados em GMP de diferentes diâmetros: 0,6 mm - 55% (85/154), 0,8 mm - 52% (83/159), 1,0 mm - 27% (38/141), 1,2 mm - 0% (0/119). Também determinaram o efeito do uso de diferentes volumes de crioprotetor sobre as taxas de formação de blastocistos: 1 $\mu$ L - 52% (60/116), 3 $\mu$ L - 52% (63/121), 5 $\mu$ L - 30% (40/135), 7 $\mu$ L - 0% (0/131). Os resultados revelaram, que os oócitos tiveram maior viabilidade pós aquecimento quando envasados em GMP de menor diâmetro interno e contidos em 1- 3  $\mu$ L de solução.

Segundo Rall (1987), minimizar o volume da solução é benéfico não só por aumentar a velocidade de resfriamento, mas também por diminuir a chance de formação de cristais de gelo na amostra. Vitrificação com mínimo volume de solução também pode evitar danos por fraturas (VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

### **2.3.2 Micropipetas de quartzo (QMC)**

As altas concentrações de crioprotetor exigidas para que se obtenha o estado vítreo são tóxicas para diversos tipos de células e tecidos, incluindo embriões. Assim sendo, a concentração da solução de vitrificação deve ser reduzida a um nível não tóxico (KATLOV *et al.*, 2006), ou a redução no tempo de exposição durante o resfriamento. Por isso, de acordo com Risco *et al.* (2007), a rapidez com que a temperatura passa através do material de envase é um ponto fundamental no processo de vitrificação. Em busca de um material de envase que possibilitasse unir a vantagem de baixa concentração de crioprotetor utilizada no congelamento, com o estado amorfo formado na vitrificação, testaram os MCQ. Os autores obtiveram o estado vítreo com uma solução utilizada para congelamento composta por PROH (1,5M) + sacarose (0,3M) comparando as QMC com as OPS convencionais usando LN<sub>2</sub> ou SLN<sub>2</sub>. As OPS possuíam diâmetro interno de 0,8 mm e espessura de parede de 0,075 mm,

contra 0,18 mm e 0,01 mm das QMC, respectivamente. A redução de diâmetro de um material comparado com o outro possibilitou a redução do volume da solução em 20 vezes. No experimento, foi medida a velocidade da curva de resfriamento através de termopares de 0,025 mm de diâmetro. A velocidade observada com as OPS foi de  $5.700 \pm 200^\circ\text{C}/\text{min}$  entre  $-20^\circ\text{C}$  e  $-150^\circ$ , com uso de nitrogênio superresfriado. Quando a solidificação foi completa a velocidade da curva aumentou significativamente, após os  $-150^\circ\text{C}$  ( $10.300 \pm 800^\circ\text{C}/\text{min}$ ). Nos QMC foi obtida uma curva de resfriamento de  $250.000^\circ\text{C}/\text{min}$ , igualmente utilizando nitrogênio superresfriado. Segundo os autores, o reduzido diâmetro interno, as paredes finas e a alta condutividade do material fazem do QMC um contêiner bastante adequado para a técnica de vitrificação.

As dimensões reduzidas do QMC e sua alta condutividade térmica ( $8 \text{ W}/(\text{m.K})$ ) comparando-se com outros materiais, incluindo as tradicionais palhetas francesas ( $0,2 \text{ W}/(\text{m.K})$ ) permitem a obtenção de curvas de resfriamento mais rápidas. Assim sendo, esta técnica tem se mostrado mais eficiente do que as técnicas de vitrificação tradicionais (LEE *et al.*, 2010). Os autores obtiveram sucesso com o uso da QMC ao buscarem um método para obter vitrificação usando baixas concentrações de crioprotetor, combinando as vantagens do congelamento tradicional com a vitrificação. Teoricamente, isso pode ser feito com uma curva ultra-rápida  $>100.000^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Em outro experimento, He *et al.* (2008) testaram a eficiência do material de envase vitrificando células do botão embrionário de camundongos em QMC em solução de vitrificação a 2,0M, composta por . Os resultados mostraram uma taxa de sobrevivência de 70% das células vitrificadas. A proliferação das células reaquecidas foi semelhante às do grupo controle não criopreservado.

Frente aos dados apresentados em literatura (RISCO *et al.*, 2007; HE *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010), foi demonstrado ser possível utilizar as QMC como envase para vitrificação. Porém, ainda não foram publicadas observações da eficiência deste material no uso em vitrificação de estágios embrionários mais avançados, como os blastocistos murinos. O objetivo deste trabalho foi

determinar a viabilidade pós-aquecimento dos blastocistos murinos vitrificados em duas SV e envasados em microcapilares de quartzo (QMC) ou de vidro (GMP). Também, observar a influência de dois diâmetros internos: 0,1mm e 0,2mm das QMC nas taxas de eclosão dos blastocistos vitrificados.

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus* ENVASADOS  
EM MICROCAPILARES DE QUARTZO

Cheuiche, Z. M., Galuppo, A., Arruda, N.S., Marques, L.S., Sicco, O.P.,  
Rodrigues, J.L.

Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução Animal da Faculdade  
de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul;  
zilahmedvet@hotmail.com

**RESUMO**

O objetivo do experimento foi determinar as taxas de sobrevivência pós vitrificação de blastocistos murinos (experimento 1) expostos à duas associações de crioprotetores e envasados em micropipetas de quartzo (QMC) ou de vidro (GMP) e, (experimento 2) comparar as taxas de sobrevivência obtidas na vitrificação dos embriões envasados em QMC de dois diâmetros internos (0,1 mm ou 0,2 mm). No experimento 1, blastocistos murinos coletados no dia 4 de desenvolvimento foram selecionados morfológicamente e divididos aleatoriamente em seis grupos. **Grupo 1** (Controle 1): embriões colocados em cultivo imediatamente após a coleta. **Grupo 2**: embriões expostos a 10% PROH + 10% EG + 0,5% PVA em PBSm (ES1) por 1 min e em seguida expostos a 20% PROH + 20% EG + 0,5% PVA em PBSm (VS1) por no máximo 30 seg, período em que foram envasados em QMC. **Grupo 3**: idem ao Grupo 2 com envase em GMP. **Grupo 4**: embriões expostos a 10% DMSO + 10% EG + 0,5% PVA em PBSm (ES2) por 1 min e em seguida expostos a 20% DMSO + 20% EG + 0,5% PVA em PBSm (VS2), por no máximo 30 seg, período em que foram envasados em QMC. **Grupo 5**: idem ao grupo 4 com envase em GMP. Após a exposição às soluções de vitrificação, os capilares foram imediatamente imersos em N<sub>2</sub> líquido. **Grupo 6** (Controle 2): embriões não vitrificados colocados em cultivo somente após o final dos procedimentos dos grupos tratados. No segundo experimento, a exemplo do primeiro, foram formados os seguintes grupos: **Grupo 1** (controle 1): embriões colocados em cultivo imediatamente após a coleta; **Grupo 2**: embriões envasados em QCM de 0,1mm de diâmetro; **Grupo 3**: embriões envasados em QCM de 0,2mm de diâmetro; **Grupo 4** (controle 2): embriões não vitrificados colocados somente após o término da vitrificação. Para vitrificação foi utilizado o tratamento 4 do experimento 1. Nos dois experimentos, os embriões vitrificados foram reaquecidos pela exposição a 0,25M de sacarose em PBSm, a 37°C, durante 5min para a retirada do crioprotetor. Após, os embriões foram transferidos para o cultivo *in vitro* em meio KSOM durante 72h. As taxas de eclosão dos blastocistos nos grupos do experimento 1 foram: **G1**: 83,07% (54/65), **G2**: 47,3% (23/49), **G3**: 38,4% (20/52), **G4**: 60,4% (29/48), **G5**: 41,1 (21/51), **G6**: 77,4% (55/71). No segundo experimento, as taxas de eclosão dos blastocistos foram: **G1**: 82,5% (33/40), **G2**: 55,3% (17/31), **G3**: 58,5% (22/38), **G4**: 82,0% (41/50). Os resultados observados nos experimentos mostraram que não houve diferença significativa na taxa de eclosão entre os grupos experimentais, entretanto, todos foram inferiores ( $P > 0,05$ ) aos controles. As soluções

utilizadas, os GMP e os dois diâmetros do QCM testados permitiram que blastocistos murinos vitrificados apresentassem taxas de sobrevivência *in vitro* semelhantes entre si.

## ABSTRACT

*The aim of the experiment was to determine the survival rates after vitrification of mice blastocysts exposed to two different associations of cryoprotectants and loaded in quartz microcapillaries (QCM) or glass microcapillaries (GMP) and, later, to compare the embryo survival rates obtained with murine blastocysts loaded into QMC with two internal diameters (0.1 mm or 0.2 mm). In experiment 1, the murine blastocysts were collected on day 4 of development and morphologically selected and randomly divided into six groups. Group 1 (control 1): not vitrified blastocysts cultured into KSOM drops immediately after collection. Group 2: embryos exposed for 1 minute at 10% PROH, 10% EG, 0.5% PVA in PBSm(ES1) and after exposed to 20% PROH, 20% EG, 0.5% PVA in PBSm (VS1) within 30 seconds, then loaded in QMC. Group 3: the same to group 2 however loaded in GMP. Group 4: exposed to 10% DMSO, 10% EG, 0.5% PVA in PBSm(ES2) and after exposed to 20% DMSO, 20% EG, 0.5% PVA in PBSm(VS2), loaded in QMC. Group 5: the same to group 4 however loaded in GMP. After exposure to vitrification solutions, the capillaries were immediately immersed in LN<sub>2</sub>. Group 6 (Control 2): not vitrified embryos placed in culture only after the end of vitrification of the treated groups. The second experiment consisted of the following groups: Group 1 (control 1) embryos transferred to culture immediately after collection; Group 2: embryos loaded in QCM with 0.1 mm internal diameter, and Group 3: embryos loaded in QCM with 0.2 mm internal diameter diameter, and Group 4 (control 2): not vitrified embryos placed in culture only after the end vitrification procedures. Groups 2 and 3 were exposed to ES2 and VS2 and later loaded in QMC 0.1 or 0.2 mm in diameter, immediately immersed in LN<sub>2</sub>. Blastocysts were warmed by exposure to 0.25 M sucrose in PBSm at 37 °C for 5min to remove the cryoprotectant. After warming, the embryos were transferred to 100 µL drops of KSOM during 72 hours. Hatching rates were observed in groups of experiment 1 were: G1: 83.07% (54/65), G2: 47.3% (23/49), G3: 38.4% (20/52), G4: 60.4% (29/48), G5: 41.1 (21/51), G6: 77.4% (55/71). In the second experiment, the blastocyst hatching rates were: G1: 82.5% (33/40), G2: 55.3% (17/31), G3: 58.5% (22/38), G4: 82% (41/50). The results observed in both experiments showed no significant difference in embryo hatching rates among the experimental groups, but all were inferior (P>0.05) to controls. The vitrification solutions used, the GMP and the QCM at two diameters tested provided similar embryo survival rates.*

## INTRODUÇÃO

Em criobiologia, o termo vitrificação é utilizado para métodos de criopreservação nos quais a amostra permanece em estado sólido amorfo ou vítreo, após seu rápido resfriamento. A vitrificação pode ser definida como a solidificação de um líquido, produzida não pela cristalização, mas por uma extrema elevação na viscosidade durante o resfriamento (FAHY *et al.*, 1984). Os primeiros trabalhos realizados com sucesso em criopreservação de embriões são de autoria de Whittinghan *et al.* (1972) e Wilmut (1972), os quais, descreveram que embriões murídeos mantinham sua viabilidade biológica após serem congelados e estocados a - 196° C em nitrogênio líquido (NL<sub>2</sub>). Mais tarde Rall e Fahy (1985) foram os primeiros a utilizar com sucesso o processo de vitrificação para a criopreservação de embriões murídeos. Desde então, a vitrificação tem se mostrado uma técnica simples, rápida e econômica para a criopreservação de embriões de diversas espécies animais com a grande vantagem de diminuir o tempo de exposição da célula as temperaturas críticas. Entretanto, em relação ao congelamento, a vitrificação apresenta desvantagens relacionadas ao estresse osmótico e a toxicidade, originadas pela exposição dos embriões a altas concentrações de crioprotetor (PAPADOPOULOS, 2002). Como alternativa para minimizar estes danos verificou-se que rápidas taxas de resfriamento reduzem a toxicidade dos crioprotetores e também diminuem o tempo de exposição da célula as temperaturas críticas (ARAV *et al.*, 1993). A rápida velocidade da curva no processo de vitrificação também permite a redução das concentrações de crioprotetor nas soluções, diminuindo assim os danos osmóticos e tóxicos. Uma das estratégias para aumento da velocidade de resfriamento é o tipo de sistema de envase dos embriões e a redução do volume da solução crioprotetora (HE *et al.*, 2008).

Vários sistemas foram desenvolvidas no intuito de aumentar a velocidade da curva e diminuir o volume da amostra. O surgimento de sistemas abertos como grades de microscopia eletrônica (Martino *et al.*, 1996), microgotas (ARAV e ZERON, 1997), *open pulled straw* - OPS (Vajta *et al.*, 1998), cryoloop (Lane *et al.*, 1999), cryotop (KUWAYAMA *et al.*, 2005), entre

outros, permitiu a obtenção de avanços de criopreservação de estruturas sensíveis ao resfriamento. Outros materiais também foram empregados no sentido de aumentar a velocidade da curva de resfriamento através da redução do diâmetro e aumento da condutividade térmica dos materiais como o vidro (CHO *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2007), metal (BUNN *et al.*, 2006) ou quartzo (HE *et al.* 2008).

Yu *et al.* (2009) avaliaram a eficiência da criopreservação em palhetas esticadas fechadas (*Closed Pulled Straws* – CPS) na sobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro*. As mórulas e blastocistos foram criopreservados através de congelamento lento, vitrificação com envase em OPS (palhetas abertas esticadas) e nas CPS. Não foram observadas diferenças significativas na viabilidade dos embriões vitrificados em OPS (26/68 – 38,7%) ou CPS (25/67 – 37,2%) após o aquecimento e 72 horas de cultivo. Entretanto, os dois grupos de vitrificação foram melhores do que o grupo de congelamento (17/63 – 27,5%), confirmando a superioridade da técnica de vitrificação sobre o congelamento de embriões bovinos provenientes de FIV.

Um dos inconvenientes da técnica de vitrificação é a exigência do emprego de altas concentrações de crioprotetor para que se obtenha o estado amorfo e se evite a cristalização do líquido celular. Porém, estas altas concentrações podem ser tóxicas às células prejudicando o funcionamento normal das organelas. Uma estratégia para reduzir a concentração da solução de vitrificação a um nível menos tóxico é aumentar a velocidade da curva de resfriamento. De acordo com Risco *et al.* (2007), a rapidez com que a temperatura é conduzida através do material de envase é um ponto fundamental no processo de vitrificação. Os autores exploraram a capacidade dos QMC, vitrificando uma solução de PROH (1,5M) e sacarose (0,3M) comparando-os com as convencionais OPS expostas ao nitrogênio líquido normal a -196°C (N<sub>2</sub>L) ou superresfriado a - 200°C (SN<sub>2</sub>L). No experimento, a curva de congelamento obtida com as OPS foi de 5.700 ± 200 °C/min entre - 20 °C e - 150 °C. Quando a solidificação foi completa a velocidade da curva aumentou significativamente, após os 150 °C (10.300 ± 800°C/min). Nos QMC não foi detectada a formação de gelo. Segundo os autores, o reduzido diâmetro interno,

as paredes finas e a alta condutividade do material fazem do QMC um contêiner bastante adequado para a técnica de vitrificação.

He *et al.* (2008) utilizaram os QMC na vitrificação de células tronco de camundongo usando baixa concentração de crioprotetor (2M de PROH e 0,6M de trealose), semelhante as utilizadas nas curvas de congelamento padrão (1-2M). Os autores obtiveram uma velocidade de curva de 100.000 °C/min, mantendo 70% das células viáveis após o reaquecimento. Lee *et al.* (2009) empregaram os QMC na vitrificação de oócitos murinos em PROH (1,5M) e trealose (0,5M) utilizando SN<sub>2</sub>L ou N<sub>2</sub>L obtiveram 90% (36/40) e 70% (28/40), respectivamente dos oócitos morfológicamente inalterados após o reaquecimento.

O objetivo deste trabalho foi determinar a viabilidade pós-aquecimento de blastocistos murinos vitrificados após exposição a duas soluções crioprotetoras e envasados em MQC ou GMP. Também, determinar as taxas de eclosão dos blastocistos vitrificados em QMC com 0,1mm ou 0,2mm de diâmetro interno.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Exceto quando indicado, todos os produtos químicos foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, E.U.A.). Os meios de cultura e soluções foram preparados com água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). O estudo seguiu as diretrizes de conduta ética no cuidado e uso de animais, instituído pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

### **Produção de embriões *Mus domesticus domesticus***

Machos (8 – 40 semanas) e fêmeas (6 – 8 semanas) da linhagem CF1 suíça albina foram utilizados nos experimentos. Os animais foram mantidos sob condições controladas de luz (14 hs/ luz e 10 hs/ escuro) e temperatura



( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Água e ração peletizada foram oferecidas *ad libitum*. As fêmeas foram superovuladas através de injeção intraperitoneal de 10 UI de gonadotropina coriônica equina (eCG - Folligon®, Intervet), seguida de uma injeção de 10 UI de gonadotropina coriônica humana (hCG - Chorulon®, Intervet) após 46 hs, quando as doadoras foram acasaladas com os machos durante a noite. Na manhã seguinte, foram identificadas as fêmeas que possuíam tampão vaginal, indicando terem sido copuladas pelos machos. Na manhã do quarto dia após a cópula as fêmeas foram sacrificadas por deslocamento cervical, e após, submetidas a retirada dos cornos uterinos. Os cornos uterinos foram perfundidos com 0,5 ml de PBS acrescido de 0,4% de BSA para recuperação das estruturas. A busca e seleção dos embriões foi realizada sob esteromicroscópio, sendo os blastocistos e blastocistos expandidos de formato esférico, apresentando células de tamanho e textura uniformes, compatíveis com o estágio de desenvolvimento foram selecionados e alocados de forma aleatória nos diferentes tratamentos.

### **Características das QMC e preparação das GMP**

Como suporte das amostras para vitrificação foram utilizados microcapilares de quartzo (*Glasinstrumentemachermeister Muller and Muller*<sup>®</sup>, Alemanha), com 0,1 ou 0,2 mm de diâmetro interno. Já as GMP foram artesanalmente confeccionadas a partir de tubos capilares de vidro, utilizados para determinação do hematócrito (*Perfecta*<sup>®</sup>, BRASIL), segundo Vieira *et al.* (2007).

### **Procedimentos para vitrificação**

No experimento 1 os embriões selecionados foram distribuídos em quatro grupos experimentais e dois grupos controle. **Grupo 1** (Controle 1) composto por blastocistos não vitrificados, transferidos para o meio de cultivo (KSOM) imediatamente após a coleta. **Grupo 2**: embriões expostos a 10% PROH + 10% EG + 0,5% PVA em PBSm (ES1) por 1 min e após expostos 20% PROH + 20% EG + 0,5% PVA em PBSm (VS1) por até 30 seg durante o envase em QMC

com 0,2mm de diâmetro interno. **Grupo 3:** semelhante ao grupo 2 usando GMP para o envase **Grupo 4:** expostos a 10% DMSO + 10% EG + 0,5% PVA em PBSm (ES2) por 1 min e após expostos a 20% DMSO + 20% EG + 0,5% PVA em PBSm(VS2), por até 30 seg durante o envase em QMC. **Grupo 5:** semelhante ao grupo 4 usando GMP para o envase. Após a exposição as soluções de vitrificação, os QMC e GMP contendo os embriões em 3 µL de solução foram imediatamente imersos em NL<sub>2</sub>. **Grupo 6:** (Controle 2) embriões colocados em cultivo somente após o final dos procedimentos de vitrificação dos grupos experimentais. No experimento 2, os embriões foram alocados em quatro grupos: **Grupo 1** (Controle 1) blastocistos não vitrificados colocados em cultivo imediatamente após a coleta; **Grupo 2:** embriões expostos a ES2 e VS2 envasados em QCM de 0,1mm de diâmetro ou 0,2 mm de diâmetro (**Grupo 3**) e **Grupo 4** (Controle 2): embriões colocados em cultivo somente após o término da vitrificação dos embriões dos grupos 2 e 3.

### **Procedimento de reaquecimento**

Os embriões vitrificados nos dois experimentos, foram estocados durante 48h em botijão de N<sub>2</sub>L. O reaquecimento a 37 °C foi realizado mergulhando-se a ponta dos capilares em gotas de 300 µL de PBS acrescido de 0,25 M de sacarose e 0,4% de BSA. Os embriões foram mantidos nesta solução por cinco min, sendo então lavados em KSOM e transferidos para o cultivo .

### **Avaliação do desenvolvimento *in vitro***

Os grupos controle e os grupos vitrificados foram cultivados *in vitro* em gotas de 100 µL de KSOM suplementado com 0,4% de BSA, sob óleo mineral, a 37°C em atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub> e umidade saturada. A taxa de eclosão dos embriões foi avaliada após 72 horas de cultivo levando-se em consideração todos os grupos experimentais.

### **Análise Estatística**

As taxas de eclosão embrionária obtidas foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado, com resíduos ajustados com nível de significância de 5%.

## Resultados

No experimento 1 as taxas de sobrevivência dos embriões expostos às diferentes soluções crioprotetoras foram semelhantes ( $P>0,05$ ), mas inferiores ( $P<0,05$ ) aos embriões dos grupos controle (Tabela 1).

**Tabela 1.** Eclosão dos blastocistos não vitrificados e vitrificados em QMC ou GMP usando DMSO ou PROH associado ao EG + sacarose (7 repetições).

Tratamentos	Embriões (N)	Eclosão	
		N	(%)
QMC DMSO	48	29 <sup>b</sup>	60,4
PROH	49	23 <sup>b</sup>	47,3
GMP DMSO	51	21 <sup>b</sup>	41,1
PROH	52	20 <sup>b</sup>	38,4
Controle 1	65	54 <sup>a</sup>	83,07
Controle 2	71	55 <sup>a</sup>	77,4

QMC (microcapilar de quartzo) GMP (micropipeta de vidro)

<sup>a,b</sup> Números na mesma coluna não possuem diferença estatística ( $P<0,05$ )

No experimento 2, não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre as taxas de sobrevivência dos embriões vitrificados em QMC de 0,1 ou 0,2mm de diâmetro interno (Tabela 2).

**Tabela 2.** Taxas de eclosão dos blastocistos murinos vitrificados em QMC de 0,1 ou 0,2 mm de diâmetro (5 repetições).

Tratamentos	Embriões (N)	Eclosão	
		N	(%)
QMC 0,2mm	38	22 <sup>b</sup>	58,5
QMC 0,1mm	31	17 <sup>b</sup>	54,8
Controle 1	40	33 <sup>a</sup>	82,5

---

Controle 2	50	41 <sup>a</sup>	82,0
------------	----	-----------------	------

---

<sup>a,b</sup> Números na mesma coluna não possuem diferença estatística ( $P < 0,05$ )

## DISCUSSÃO

O trabalho teve como objetivo determinar a sobrevivência *in vitro* de blastocistos murinos vitrificados usando duas soluções crioprotetoras e envase em GMP ou QMC e determinar a influência de dois diâmetros internos do QMC na vitrificação. Apesar da ausência de diferença ( $P > 0,05$ ) nos resultados entre os grupos submetidos à vitrificação, numericamente, houveram mais blastocistos eclodidos no grupo envasado em QMC de 0,2 mm em comparação a QMC de 0,1 mm e a GMP. Diferentes trabalhos foram publicados (CHO *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2007; RISCO *et al.* 2007; TAN *et al.*, 2009) confirmando a eficiência dos envases de paredes finas e alta condutividade térmica no aumento das taxas de sobrevivência embrionária.

Até o momento, não foi relatado o uso deste material em estágios embrionários mais avançados, como os blastocistos murinos utilizados neste experimento. As características dos blastocistos (multicelularidade, presença de blastocele) tornam mais difícil a obtenção de um nível satisfatório de desidratação e viscosidade uniforme em todos os blastômeros, necessário para vitrificação adequada (VANDERZWALMEN *et al.*, 2000). Isto pode resultar em aumento de células em apoptose após o reaquecimento (KADER *et al.*, 2009). Apesar de vários estudos reportarem sucesso em vitrificação de blastocistos humanos (MUKAIDA *et al.*, 2003; VANDERZWALMEN *et al.*, 2000) e animais (LANE *et al.*, 1999; CHO *et al.*, 2002), sua própria estrutura torna esta tarefa desafiadora. O crioprotetor penetra lentamente devido à multicelularidade. Além disso, a blastocele pode ser insuficientemente desidratada durante a vitrificação se o tempo de exposição e a concentração da solução forem muito reduzidos. Por estes motivos, ainda existe o risco de formação de cristais de gelo intracelular

Utilizando uma solução crioprotetora composta por uma associação de glicerol e propilenoglicol (semelhante a uma das utilizadas neste experimento), Cseh et al., (1999) compararam a viabilidade pós reaquecimento de embriões em estágios de desenvolvimento diferentes. Os autores obtiveram 70% (52/74) de eclosão das mórulas compactas e 57% (40/70) dos blastocistos expandidos, O estudo mostrou maior resistência à vitrificação do estágio mais jovem, o que poderia ser considerado em experimentos futuros utilizando-se os mesmos tipos de envase.

Outra estratégia utilizada na tentativa de reduzir os danos foi a combinação de crioprotetores e a exposição em duas etapas. Segundo Kader (2010), o emprego de dois crioprotetores permeáveis reduz a concentração individual das substâncias e, conseqüentemente, a toxicidade. A exposição em dois passos faz com que os blastocistos se equilibrem em uma solução menos concentrada antes da curta exposição à solução de vitrificação (LIEBERMANN *et al.*, 2002). No nosso trabalho foram testados diâmetros internos do QMC não se observando diferença ( $P>0,05$ ) entre as taxas de eclosão, 58,5% (17/31) e 54,8% (20/38) para os diâmetros de 0,1 e 0,2 mm, respectivamente. A redução em 50% no diâmetro interno do capilar também foi testada por Tan *et al.*, (2009) vitrificando oócitos e blastocistos murinos em capilares de vidro com 0,6, 0,8 e 1,2 mm. Não houve diferença entre as taxas de sobrevivência dos oócitos e blastocistos quando envasados em capilares com diâmetro entre 0,6 mm (85/154) e 0,8 mm (83/159), diferindo da sobrevivência dos embriões envasados em capilares com 1,2 mm (38/141). Mesmo assim, os resultados mostraram que a condutividade térmica tem influência no desenvolvimento *in vitro* pós-aquecimento.

Apesar da semelhança das taxas de sobrevivência de blastocistos comparando-se GMP com o QMC, notou-se uma maior facilidade na manipulação do primeiro, devido principalmente à fina espessura dos QMC que lhes confere grande fragilidade. Além disso, o alto custo de aquisição do material poderia tornar-se um obstáculo para o seu emprego na criopreservação de embriões de espécies domésticas de interesse comercial.

As taxas de eclosão dos blastocistos obtidas no experimento foram menores que os 70% (73/105) reportados por Rodriguez (2009), utilizando as micropipetas de vidro produzidas industrialmente e a mesma solução contendo associação de EG e PROH, em condições de laboratório semelhantes. Entretanto, fatores como genética, diversidade nos tipos de envase (VAJTA e NAGY, 2006), tipos e associações entre crioprotetores empregadas na desidratação e vitrificação (ALI e SHELTON, 1993; KULESHOVA *et al.*, 2001), estágio de desenvolvimento dos embriões (BERTOLINI *et al.*, 2005), além das condições de laboratório, exercem efeito sobre o potencial de desenvolvimento dos embriões pós vitrificação, levando a uma alta variabilidade dos resultados, dificultando a comparação entre experimentos. Apesar de ser praxe a comparação entre experimentos semelhantes esta não é recomendada.

Trabalhos desenvolvidos recentemente sugerem que o esvaziamento da blastocele por micromanipulação é uma alternativa viável para aumentar a sobrevivência dos blastocistos murinos pós aquecimento (KADER *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2009). Assim foram mantidos 95% de integridade de DNA nos blastocistos que tiveram a eclosão assistida contra 84,3% do grupo controle. Mukaida *et al.* (2006) reportaram que a expansão da blastocele poderia reduzir a sobrevivência dos blastocistos humanos reaquecidos. Os autores realizaram a punção da blastocele através de microagulha ou laser e obtiveram maior taxa de sobrevivência nos embriões micromanipulados pré-vitrificação: 97,2% (488/502), em estudos anteriores, sem que houvesse punção foi obtida taxa de sobrevivência de 86%. Após a transferência dos blastocistos manipulados, 60,2% das pacientes ficaram grávidas, um índice mais alto do que nos trabalhos anteriores (34,1%, 29/85).

## **CONCLUSÃO**

Os QMC apresentam eficiência semelhante ao GMP para a vitrificação de blastocistos murinos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior pela concessão da bolsa de estudos e ao Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução pelo financiamento do projeto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, J.; SHELTON; J. N. Design vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 471-477, 1993. Abstract.

ARAV A., SHEHU D., MATTIOLI M., Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. **J. Reproduction Fertility**; 99: 353-8, 1993.

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**, v. 72, p. 341. 1997.

BERTOLINI M, LANGE MC, RODRIGUES JL. *In vitro* and *in vivo* survival of mouse morulas and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. **Acta Scient Vet**: 33:245-251, 2005.

BUNN, S.; BERTOLINI M., CRUZ, F.B.; VIEIRA, A.D.; PEDRAZZI, C; CESARO, M.P.; ORTIGARI, I.; RIBEIRO, E.S.; MEZZALIRA J.C.;MEZZALIRA A. Reduction in cryoprotectant concentrations on the vitrification of immature bovine oocytes, under a high cooling rate. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 309, 2006.

CHO, S.K; CHO, S.G.; BAE, I.H.; PARK, C.S.; KONG, I.K. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). *Animal Reproduction Science*, v. 73, 151–158. 2002.

CSEH S., HORLACHER W., BREM G., CORSELLI J., SEREGI J., SOLT L. Vitrification of mouse embryos in two cryoprotectant solutions. *Theriogenology*; 52: 103–13 1999.

CREMADES, N., SOUSA, M; SILVA J., VIANA P., SOUSA S., OLIVEIRA C., TEIXEIRA DA SILVA, J., BARROS, A. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. **Human Reproduction**, v. 19, p. 300-305, 2004.

DHALI A.; ANCHAMPARUTHY V.M., BUTLER S.P., PEARSON R.E., MULLARKY I.K, GWAZDAUSKAS F.C. Effect of droplet vitrification on development competence, actin cytoskeletal integrity and gene expression in in vitro cultured mouse embryos. **Theriogenology** 71; 1408–1416, 2009.

EI-GAYAR, M.; GAULY, M.; HOLTZ, W. One-step dilution of open-pulled-straw (OPS)-vitrified mouse blastocysts in sucrose-free medium. **Cryobiology**, v. 57, p. 191–194, 2008.



FAHY, G.M. ; MAcFARLENE, D.R ; ANGELL, C.A. ; MERYMAN H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, p. 407 – 426, 1984.

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.

ISACHENKO E., ISACHENKO V., RAHIMI G., NAWROTH F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biology**;108:186–93. 2003.

KADER A. , CHOI A., ORIEF Y., AGARWAL A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 7:99, 2009.

KADER A., AGARWAL A., ABDELRAZIK H., SHARMA R.K., AHMADY A., FALCONE T. Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. **Fertil Steril**; 91:2087–94. 2010.

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.

KULESHOVA, L.L.; SHAW, J.M.; TROUNSON, A.O. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. **Cryobiology**, v. 38, p.119-130, 2001.

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

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.

LEE H., ELMOAZZEN H., WRIGHT D., BIGGERS J., RUEDA B. R., HEO Y. S., TONER M., TOTH T. L. Ultra-rapid vitrification of mouse oocytes in low cryoprotectant concentrations. **Reproductive BioMedicine Online**; 11, 1-8 , 2009.

LIEBERMANN, J.; TUCKER, M.; GRAHAM, J.R.; HAN, T.; DAVIS, A.; LEVY, M.J. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 4, p.146-150, 2002.

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.

MUKAIDA T., TAKAHASHI K., KASAI M.: Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. **Reprod Biomed Online**; 6:221-225, 2003.

MUKAIDA T, OKA C, GOTO T, TAKAHASHI K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a microneedle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. **Hum Reprod**; 21: 3246–52. 2006.

PAPADOPOULOS S., RIZOS D., DUFFY P., WADE M., QUINN K., BOLAND M. P. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh, in vitro or in vivo produced ovine blastocysts. **Animal Reproduction Science**; 74: 35-44, 2002.

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

RISCO R., ELMOAZZEN H., DOUGHTY M, HE X, TONER M. Thermal performance of quartz capillaries for vitrification. **Cryobiology**;55:222–229. 2007.

RODRIGUEZ, P. Vitriificação de blastocistos *mus domesticus domesticus* expostos à solução crioprotetora com dimetilformamida e envase em microcapilares produzidos industrialmente. **Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

TAN X., SONG E., LIU X., YOU W., WAN F. Factors affecting the survival, fertilization, and embryonic development of mouse oocytes after vitrification using glass capillaries. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal**. V. 45, p. 420–429, 2009.

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., BOOTH P.J., HOLM P., GREVE P., CALLESEN H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo Letters**; 18:191–5, 1998.

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.

VANDERZWALMEN, P. ECTORS F., GROBET L., PRAPAS Y., PANAGIOTIDIS Y., VANDERZWALMEN S., STECHER S., FRIAS P., LIEBERMANN J., ZECH NH 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.

VIEIRA, AD.; FORELL, F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J.L. In-straw cryoprotectant dilution of IVP bovine blastocysts vitrified in hand-pulled glass micropipettes. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 377-383, 2007.

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, p. 1071-1079, 1972.

YU X.L.; DENG W.; LIU F.J., LI Y.H.; LI X.X.; ZHANG Y.L.; ZAN L.S. Closed pulled straw vitrification of in vitro–produced and in vivo–produced bovine embryos. **Theriogenology**, 2009.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O método de criopreservação biológica por vitrificação representa uma importante biotecnologia por possibilitar a estocagem segura de material genético para uso posterior. Em produção animal, a crioconservação de gametas e embriões tornou possível a comercialização e disseminação deste material para fins de melhoramento genético. Experimentos futuros realizados na área devem ter por objetivo adequar os protocolos a fim de garantir a sobrevivência tanto *in vitro* quanto *in vivo* dos oócitos e embriões após o re-aquecimento.

É de suma importância conhecer as características dos crioprotetores a fim de adequar as associações em concentrações adequadas para que os efeitos tóxicos e bioquímicos não causem danos excessivamente extensos às células embrionárias. O envase feito com material de alta condutibilidade térmica permite que se reduzam estas concentrações em função da obtenção de alta velocidade de resfriamento. Os microcapilares de quartzo apresentam características favoráveis para a utilização de curvas de alta velocidade devido a sua alta condutividade térmica. Estudos posteriores poderão aperfeiçoar seu uso testando-o como envase em estágios embrionários mais jovens ou embriões de espécies de interesse comercial. Assim como os procedimentos de manipulação e estocagem em botijão de nitrogênio.

A observação dos fenômenos biológicos que ocorrem na criopreservação embrionária assim como a compreensão dos efeitos dos crioprotetores e dos fenômenos termodinâmicos possibilitarão um aumento na sobrevivência pós-aquecimento e uma utilização mais eficiente do material biológico crioconservado.

## Referências Bibliográficas

AGUIAR, P.R.L. RODRIGUES, J.L.R. Vitriificação de embriões *Mus musculus* em 9,0 M de etileno-glicol. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, 21-29, p. 1997.

ANCHORDOGUY T. J.; RUDOLPH A.S., CARPENTER J.F., CROWE J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. **Cryobiology**, 24:324–31,1987.

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., SHEHU D., MATTIOLI M., Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. **J. Reproduction Fertility**; 99: 353-8, 1992.

ARAV A., ZERON Y. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is affected by the composition and concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. **Theriogenology**;47:341–2, 1997.

ARAV, A.; YAVIN S.; ZERON Y.; NATAN D.; DEKEL I.; GACITUA H. New trends in gamete's cryopreservation. **Molecular and cellular endocrinology**. 187(1-2):77-81. 2002.

ASADA M, ISHIBASHI S, IKUMI S, FUKUI Y. Effect of polyvinil alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 58, p. 1199-1208, 2002.

ASSAF, S.S. et al. Vitriificação de embriões *Mus domesticus domesticus* contidos em volumes diferentes de 9,0 M de etileno glicol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (1), p. 990, 2007.

BAUDOT A., ALGER L., BOUTRON P. Glass-forming tendency in the systemwater-dimethyl sulfoxide. **Cryobiology**;40:151–8, 2000.

BAUDOT A., ODAGESCU V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions. **Cryobiology**;48:283–94, 2004.

BUNN, S.; BERTOLINI M., CRUZ, F.B.; VIEIRA, A.D.; PEDRAZZI, C; CESARO, M.P.; ORTIGARI, I.; RIBEIRO, E.S.; MEZZALIRA J.C.;MEZZALIRA A. Reduction in cryoprotectant concentrations on the vitrification of immature bovine oocytes, under a high cooling rate. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 309, 2006.

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.

CAMPOS-CHILLÓN L. F., SUH T. K., BARCELO-FIMBRES M., SEIDEL JR, CARNEVALE E. M., Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. **Theriogenology**; 71:349–354, 2009.

CHO, S.K; CHO, S.G.; BAE, I.H.; PARK, C.S.; KONG, I.K. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette (GMP). **Animal Reproduction Science**, v. 73, 151–158. 2002.

CÔRTEZ, CGP.; RODRIGUES, JL. Sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em meio contendo 9,0 M de etileno glicol na presença de sacarose. **Ciência Rural**, v. 30, p. 461-467, 2000.

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

COURBIÈRE B., BAUDOT A., MAZOYER C., SALLE B., LORNAGE J. La vitrification : technique d'avenir pour la cryoconservation ovarienne ? Bases physiques de cryobiologie, avantages et limites. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**; 37 803–813: 2009.

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

DOBRINSKY J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**. V. 45, pag. 17-26, 1996.

EL-GAYAR, M.; AL YACOUB, A. N.; GAULY, M., HOLTZ, W. Superior pregnancy rates with the transfer of open pulled straw-vitrified v. conventionally cryopreserved embryos in goats. **Reproduction, Fertility and Development**; v. 23, p. 141, 2011a. Abstract.

FAHY G.M.; McFARLANE D. R.; ANGELL C.A.; MERYMAN H.T Cryoprotectant toxicity: biochemical or osmotic? **Cryo-Letters**; 5:79–90, 1984

FAHY, G.M. 'Cryopharmacological' aspects of vitrification solutions. **Cryobiology**, v.55, p.351-352, 2007.

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.

HOLT W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**; 53: 47-58, 2000.

HOTZEL M. J; RODRIGUES J. L. Efeito do período de equilíbrio na solução crioprotetora intracelular a 20°C na sobrevivência In Vivo de blastocistos *Mus musculus* vitrificados. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**. V. 20, pag. 173-187, 1992.

HREDZAK, R. et al. Clinical experience with a modified method of human embryo vitrification. **Ceska Gynekologie**, v. 70, p. 99-103, 2005.

ISACHENKO E., ISACHENKO V., RAHIMI G., NAWROTH F. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**;108:186–93. 2003.

ISHIMORI, H.; TAKAHASHI, Y. and KANAGAWA H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectant mixtures. **Theriogenology**, v.37, p.481-487, 1992.

KADER A. , CHOI A., ORIEF Y., AGARWAL A. Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 7:99, 2009.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, 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.

KATLOV I.I., ISACHENKO V. ISACHENKO E. Low and high temperature vitrification as a new approach to bio stabilization of reproductive and progenitor cells. **Int. J. Refrig**. 29: 346–357, 2006.

KHURANA, N. K.; NIEMANN H. Energy Metabolism in Preimplantation Bovine Embryos Derived In Vitro or In Vivo. **Biology of Reproduction**: 62, 847–856, 2000.

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

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed method for vitrification of human embryos and the elimination of

potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11 , P. 608-614, 2005.

KULESHOVA, L.L.; SHAW, J.M.; TROUNSON, A.O. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, v. 38, p.119-130, 2001.

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

LANE M., SCHOOLCRAFT W.B., GARDNER D.K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and Sterility**;72:1073–8, 1999.

LEE H., ELMOAZZEN H., WRIGHT D., BIGGERS J., TONER M., TOTH T. Ultra-rapid vitrification of oocytes in low cryoprotectant concentration using quartz capillary. **Fertility and Sterility**, 92: 71-71, 2010.

LEIBO S.P.A. One-Step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**; 21:767-90, 1984.

LIEBERMANN J., NAWROTH F., ISACHENKO V., ISACHENKO E., RAHIMINI G., TUCKER M.J. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology* **Reproduction**;67:1671–80, 2002.

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.

LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Vitriificação de embriões Mus Musculus. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 18, p. 52, 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.

LUYET B. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. **Biodynamica**, 1937.

MACEDO M. C. JR, LUCIA T. JR, RAMBO G., FERREIRA FILHO E. B., FABIANE C., CABRAL M., DESCHAMPS J. C., In vitro penetration of swine oocytes by homologous spermatozoa: Distinct systems for gamete's co-incubation and oocyte's cryopreservation. **Animal Reproduction Science**; 117: 295-301, 2010.

MAHMOUDZADEH, A.R., VAN SOOM, A., YSEBAERT, M.T., DE KRUIF, A. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro produced cattle embryos. **Theriogenology** 42, 1387–1397, 1995.



MANJUNATHA, B. M.; GUPTA, P. S. P.; RAVINDRA, J. P.; DEVERAJ, M.; NANDI, S. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. **The Veterinary Journal**, 179: 287-291, 2009.

MASSIP A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. **Reproduction in Domestic Animal**, v.36, p. 49-55. 2001

MARTINO A., SONGSASEN N., LEIBO S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultr-rapid cooling. **Biology Reproduction**; 54:1059–69, 1996.

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

MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and non equilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophys.** V.17: 53-92, 1990.

MUKAIDA T, OKA C, GOTO T, TAKAHASHI K. Artificial shrinkage of blastocoeles using either a microneedle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. **Hum Reprod**; 21: 3246–52. 2006.

NEDAMBALE A. T. L.; DINNYÉS, A.; GROENC, B. W.; , DOBRINSKY, J. R.; TIAN, X. C.; XANG, X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**; v. 62: 437-449, 2004.

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

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, 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.

PAPADOPOULOS S., RIZOS D., DUFFY P., WADE M., QUINN K., BOLAND M. P. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh, in vitro or in vivo produced ovine blastocysts. **Animal Reproduction Science**; 74: 35-44, 2002.

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.; 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**, San Diego, California, v.24, p.387-402, 1987.

REZAZADEH M., EFTEKHARI-YAZDI P., KARIMIAN L., HASSANI F., MOVAGHAR P. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. **J Assist Reprod Genet**, 2009.

RÍOS G. L., MUCCI N. C., KAISER G.G., ALBERIO R. H. Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**; 118:19–24, 2010.

RISCO R., ELMOAZZEN H., DOUGHTY M, HE X, TONER M. Thermal performance of quartz capillaries for vitrification. **Cryobiology**; 55:222–229. 2007.

RODRIGUEZ, P. Vitricificação de blastocistos mus domesticus domesticus expostos à solução crioprotetora com dimetilformamida e envase em microcapilares produzidos industrialmente. **Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RUBINSKY B., ARAV A., DEVRIES A.L. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from Antarctic fishes. **Cryobiology**; 29: 69–79, 1992.

SANTIN T.R., BLUME H., MONDADORI G.F. Criopreservação de embriões-metodologias de vitricificação. **Veterinária e Zootecnia**; 16: 561-574, 2009.

SEIDEL Jr, G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation, **Theriogenology** 65, pp. 228–235, 2006.

SHIRAZI A., SOLEIMANI M., KARIMI M., NAZARI H., AHMADI E., HEIDARI B., Vitrification of in vitro produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. **Cryobiology**; 60 204–210, 2010.

STACHECKI, J. J.; GARRISI, J.; SABINO, S.; CAETANO, J.P.J.; WIEMER, K. E.; COHEN, J. A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. **Reproductive BioMedicine Online**; v 17. n 3. p. 360-367, 2008.

TAN X., SONG E., LIU X., YOU W., WAN F. Factors affecting the survival, fertilization, and embryonic development of mouse oocytes after vitrification using glass capillaries. **In Vitro Cell.Dev.Biol. Animal**. V. 45, p. 420–429, 2009.

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., BOOTH P.J., HOLM P., GREVE P., CALLESEN H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo Letters**; 18:191–5, 1998a.

VAJTA, G. HOLM, P., KUWAYAMA M., BOOTH, P.J. JACOBSEN, H., GREVE, T., CALLESEN, H. Open.Pulled Straw (OPS) Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, 51:53–58, 1998b.

VAJTA G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 357-364, 2000.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v. 65, p. 236–244, 2006.

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. Vitrification in ART? Getting closer? **Acta Scientiae Veterinarie**. 38 (supl 2): s565-572, 2010.

VANDERZWALMEN, P; BERTIN G.; DEBAUCHE V. 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.

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, 2007.

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.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**: 60, p. 11-22, 2009.

YAVIN S., ARAV A. Development of immature bovine oocytes vitrified by the minimum drop size technique and a new vitrification apparatus (VitMaster). **Cryobiology**;43:33, 2001.

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

YAVIN, S.; AROYO A.;ROTH Z.; ARAV A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. **Human Reproduction**, p. 1–8, 2009.

YU X.L., DENG W., LIU F.J.,LI Y.H , LI X.X., ZHANG Y.L., ZAN L.S.. Closed pulled straw vitrification of in vitro–produced and in vivo–produced bovine embryos. **Theriogenology**, 2009.

ZHANG, J.; CUI, J.;LING, X, LI, X.; PENG Y.; GUO X.; HENG, B. C.; TONG, G. Q. Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method. **J Assist Reprod Genet**. V. 26:621–628, 2009.

**ANEXOS**

**PROTOCOLO DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES MURINOS**

**DATA COLETA:** \_\_\_\_\_ **ROTINA No.**

\_\_\_\_\_

No. Fêmeas superovuladas \_\_\_\_\_ No. Placas positivas \_\_\_\_\_

**DADOS COLETA:** \_\_\_\_\_ Hora Inicio \_\_\_\_\_ Hora termino

\_\_\_\_\_

No. FÊMEA	Degenerados	Morulas	Blastocistos iniciais	Blastocistos	Blastocistos expandidos	TOTAL
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
TOTAL						

**TRATAMENTOS:**

Hora Início \_\_\_\_\_ Hora término \_\_\_\_\_

No. FÊMEA	CONTROLE	GMP	QMC
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
TOTAL			



**AQUECIMENTO:**

**DATA:** \_\_\_\_\_

Hora Início \_\_\_\_\_ Hora término \_\_\_\_\_

**CULTIVO:**

Hora Início \_\_\_\_\_ Hora término \_\_\_\_\_

PLACA 1			PLACA 2		
GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3	GRUPO 4	GRUPO 5	GRUPO 6

PLACA 3			PLACA 4		
CONTROLE 2			GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3

PLACA 5			
GRUPO 4	CONTROLE 1	CONTROLE 2	