

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

SOBREVIVÊNCIA *IN VITRO* DE BLASTOCISTOS *Mus domesticus domesticus*  
VITRIFICADOS EM MACRO OU MICROVOLUME DE CRIOPROTETOR

ALEXANDER NIVIA OSUNA

PORTO ALEGRE

2008

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

SOBREVIVÊNCIA *IN VITRO* DE BLASTOCISTOS *Mus domesticus domesticus*  
VITRIFICADOS EM MACRO OU MICROVOLUME DE CRIOPROTETOR

Autor: Alexander Nivia Osuna

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

2008

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

A comissão Examinadora, abaixo assinada,  
Aprova a Dissertação de Mestrado

*SOBREVIVÊNCIA IN VITRO DE BLASTOCISTOS Mus domesticus domesticus*  
VITRIFICADOS EM MACRO OU MICROVOLUME DE CRIOPROTETOR

Elaborada por

ALEXANDER NIVIA OSUNA

Como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Dr. José Luiz Rodrigues  
FAVET/UFRGS-RS  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Dr. Marcelo Bertolini  
Faculdade de Veterinária da UDESC, Lages- RS  
Membro da Comissão

---

Dr. Alexandre Tavares Duarte de Oliveira  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto  
Alegre – UFCSPA - RS  
Membro da Comissão

---

Dr. Rui Fernando Félix Lopes  
DCM/ICBS/UFRGS-RS  
Membro da Comissão

---

Dra. Adriana Bos Mikich  
DCM/ICBS/UFRGS-RS  
Membro da Comissão

Porto Alegre, 26 de Fevereiro de 2008

*A mi mamá Inés  
y  
hermana Cindy.*

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos para a realização do curso de mestrado, através da Embaixada do Brasil na Colômbia.

Aos colegas, bolsistas e estagiários do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução: Daniela Scherer da Silva, Paula Rodriguez Villamil, Artur Emílio Freitas e Silva, Luiz Felipe Steigleder, Mateus da Costa Lange, Alexandre Aiquel Vaz Costa, Felipe Ledur Ongaratto, Eduardo Allix e à funcionária Leda Gomes agradeço pela colaboração e amizade.

Especialmente agradeço a minha mãe Inés Osuna e irmã Cindy Nivia pelo seu apoio durante cada minuto desta caminhada, mesmo assim estando na Colômbia (Bogotá) estiveram ao meu lado. Agradeço pelo seu imenso amor, carinho e compreensão para concretizar esta etapa da minha vida. Vocês são e serão os estímulos da minha existência. GRACIAS MADRE Y HERMANITA.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

## RESUMO

O desenvolvimento de protocolos eficientes para a vitrificação de embriões mamíferos ainda é um desafio para os especialistas em reprodução. Soluções crioprotetoras de baixa toxicidade associadas a técnicas seguras de envase são fatores fundamentais, para proporcionarem uma eficiente identificação e controle sanitário das amostras. Dois experimentos foram realizados para determinar a taxa de sobrevivência de embriões *Mus domesticus domesticus* envasados em palhetas convencionais (0,25 mL), na presença de uma haste metálica de ouro, empregando soluções crioprotetoras descritas para a vitrificação em microvolume. No experimento 1, avaliou-se a toxicidade da solução de desidratação (SD: PBSm + 10% EG + 10% PROH + 0,5 M sacarose), expondo-se os embriões por diferentes tempos: 1 (T1), 3 (T2) ou 10 min (T3). A toxicidade da solução de vitrificação (SV: PBSm + 20% EG + 20% PROH) foi determinada pela exposição dos embriões durante 25, 60 ou 180 seg, previamente desidratados por 1 ou 3 min. No experimento 2, avaliou-se a utilização do macrovolume (palhetas com a haste de ouro) e microvolume (micropipetas de vidro - GMP) na vitrificação dos blastocistos expostos à SV por 25 seg, previamente desidratados por 1 ou 3 min. Os dados foram analisados pelo teste Qui-Quadrado ( $P < 0,05$ ). No experimento 1, não foi observada diferença estatística entre as taxas de eclosão dos embriões desidratados: T1=68,0% (38/56), T2=72,0% (36/50), T3=71,0% (39/55) e o grupo controle, (74,0% - 48/65). No entanto, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na taxa de eclosão em relação ao tempo de exposição dos embriões à SV. Os embriões desidratados por 1 ou 3 min e expostos à SV por 25 seg proporcionaram maiores taxas de re-expansão (79,0% vs 84,0%) e de eclosão (58,0% vs 72,0%), em relação aos tempos de exposição de 60 e 180 seg. No experimento 2, após a vitrificação dos embriões envasados nas palhetas com a haste de ouro, a taxa de eclosão dos blastocistos previamente desidratados por 1 min foi de 16,0% (10/64) e de 4,0% (2/57) quando previamente desidratados por 3 min. Por outro lado, os embriões envasados nas GMP, e previamente desidratados por 3 min, foram os que apresentaram maior taxa de eclosão (60,0% - 52/86). A vitrificação de embriões utilizando soluções crioprotetoras descritas para microvolume não foi eficiente na crioproteção dos blastocistos envasados em palhetas convencionais com a haste de ouro.

Palavras chaves: vitrificação, blastocisto, murino, macrovolume, microvolume.

## ABSTRACT

*The development of efficient vitrification protocols for mammalian embryos still is a challenge for reproductive biologists. Low toxicity cryoprotectant solutions and safe vitrification procedures that allow sample identification and sanitary control are fundamental factors. Two experiments were conducted to determine the survival rate of vitrified *Mus domesticus domesticus* embryos loaded into straws containing a metallic piece (manufactured in gold), using cryoprotectant solutions described for microvolume vitrification procedures. In Experiment 1, the toxicity of the dehydration solution (SD: PBSm +10% EG + 10% PROH + 0,5 M sucrose) was evaluated using three different embryo exposure times: 1 (T1), 3 (T2) or 10 min (T3), in addition as well as the toxicity of the vitrification solution (SV: PBSm + 20% EG + 20% PROH) was also tested upon embryo exposure for 25, 60 or 180 sec, previously dehydration for 1 or 3 min. In Experiment 2, the use of macrovolume (straw with a stem of gold) or microvolume (glass micropipettes – GMP) was evaluated for the vitrification of blastocysts after exposure to SV for 25 sec and previous dehydration for 1 or 3 min. Data were analyzed by the Chi-square test ( $P < 0,05$ ). In Experiment 1, statistical differences were not observed between hatching rates of dehydrated embryos: T1=68.0% (38/56), T2=72.0% (36/50), T3=71.0% (39/55) and control group embryos, (74.0% - 48/65). However, a significant difference ( $P < 0,05$ ) was observed between hatching rates after embryos exposure to the SV. Embryos dehydrated for 1 or 3 min and exposed for 25 sec to the SV showed higher re-expansion (79.0% vs. 84.0%) and hatching rates (58.0% vs. 72.0%) than embryos exposed to SV for 60 or 180 sec. In Experiment 2, after vitrification of the embryos loaded into straws containing a metallic piece showed a hatching rate of 16.0% (10/64) when previously dehydrated for 1 min, and 4.0% (2/57) when for 3 min. On the other hand, embryos loaded into GMP, previously dehydrated for 3 min, showed a higher hatching rate, (60.0% - 52/60). Embryo vitrification using a cryoprotectant solution described as suitable for microvolume was not efficient to cryoprotect blastocysts loaded into macrovolume straws containing a metallic piece.*

*Keywords: vitrification, blastocyst, mouse, macrovolume, microvolume.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitro(s)
μm	micrômetro(s)
°C	graus Celsius
BE	blastocisto eclodido
BI	blastocisto inicial
BL	blastocisto
BN	blastocisto em eclosão
BX	blastocisto expandido
BSA	albumina sérica bovina (bovine serum albumin)
cm	centímetro(s)
COCs	complexo(s) cumulus ovócito
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CPS	palheta esticada fechada (closed pulled straw)
DMSO	dimetilsulfóxido - Me <sub>2</sub> SO
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina (equine chorionic gonadotropin)
EG	etilenoglicol
EM	grades de microscopia eletrônica (electron microscope grids)
FDP	pipeta flexpet de desnudação (flexipet denuding pipette)
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
GL-Tip	ponteiras de pipeta gilson (P10) utilizadas no preparo de géis de eletroforese (Gel-Loading Tips)
GLY	glicerol
GMP	micropipeta de vidro (glass micropipette)
g	grama(s)
hCG	gonadotrofina coriônica humana (human chorionic gonadotropin)
HS	sistema de hemi-palheta (hemi-straw system)
h	hora(s)
ICSI	injeção intracitoplasmática de espermatozóide
IETS	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (International Embryo Transfer Society)
IMV	Instrumentos Médicos Veterinários



Kg	quilogramas
KSOM	meio de cultivo simplificado acrescido de potássio (potassium simple optimized medium)
M	molar
MDS	tamanho mínimo da gota (minimum drop size)
mg	miligrama(s)
MII	metáfase II
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mm	milímetro(s)
MM	meio de manutenção
MO	mórula
mOPS	palheta esticada lacrada (sealed open pulled straw)
mOsm	miliosmol(is)
MVC	volume mínimo de congelação (minimum volume cooling)
N	número
NL <sub>2</sub>	nitrogênio líquido
O <sub>2</sub>	oxigênio
OPS	palheta aberta e esticada (open-pulled straw)
PBSm	solução salina fosfatada tamponada modificada (phosphate buffer solution modified)
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
PN	pronúcleo
PROH	1,2-propanediol
PVA	álcool polivinílico
PVP	polivinil-pirrolidona
SA	solução de aquecimento
SD	solução de desidratação
SEE	soro de égua em estro
seg	segundo(s)
SFB	soro fetal bovino
SN <sub>2</sub>	nitrogênio ultra-resfriado (-200°C)

SOPS	palheta esticada aberta superfina (super-fine open-pulled straw)
SSV	vitriificação em superfície sólida (solid surface vitrification)
SV	solução de vitriificação
SVE	soro de vaca em estro
T1	tratamento 1
T2	tratamento 2
T3	tratamento 3
T4	tratamento 4
UI	unidade internacional
w/v	peso/volume

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Taxas de re-expansão e eclosão dos embriões de camundongo expostos por diferentes tempos à solução de desidratação (SD).....	40
Tabela 2 -	Taxas de re-expansão e eclosão dos embriões de camundongo expostos por 1 min à solução de desidratação (SD) e por diferentes tempos na solução de vitrificação (SV).....	40
Tabela 3 -	Taxas de re-expansão e eclosão dos embriões de camundongo expostos por 3 min à solução de desidratação (SD) e por diferentes tempos na solução de vitrificação (SV).....	41
Tabela 4 -	Taxas de re-expansão e eclosão dos embriões de camundongo vitrificados com macro ou microvolume, previamente expostos por 1 min na solução de desidratação (SD) e 25 seg na solução de vitrificação (SV).....	41
Tabela 5 -	Taxas de re-expansão e eclosão dos embriões de camundongo vitrificados com macro ou microvolume, previamente expostos por 3 min na solução de desidratação (SD) e 25 seg na solução de vitrificação (SV).....	42
Tabela 6 -	Taxa de recuperação dos embriões de camundongo vitrificados com macro ou microvolume.....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Minipalmeta francesa (0,25 mL, IMV®, L'Aigle, France) com a haste de ouro.....	37
Figura 2 - Técnica de aquecimento dos embriões de camundongo. (A) Minipalmetas com a haste de ouro; (B) GMP; (C) Placa de petri com os embriões.....	39

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Histórico</b> .....	16
<b>2.2</b>	<b>Crioprotetores</b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Vitrificação</b> .....	21
2.3.1	Macrovolume.....	21
2.3.2	Microvolume.....	23
<b>3</b>	<b>ARTIGO</b>	
	SOBREVIVÊNCIA <i>IN VITRO</i> DE BLASTOCISTOS <i>Mus domesticus domesticus</i> VITRIFICADOS EM MACRO OU MICROVOLUME DE CRIOPROTETOR.....	31
	RESUMO.....	31
	ABSTRACT.....	33
	INTRODUÇÃO.....	34
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
	Meios e reagentes.....	35
	Animais.....	35
	Superovulação.....	36
	Coleta dos embriões.....	36
	Preparação das micropipetas de vidro (GMP).....	36
	Palhetas com a haste de ouro.....	37
	Experimento 1.....	37
	Experimento 2.....	38
	Aquecimento dos embriões.....	38
	Cultivo embrionário.....	39
	Análise estatística.....	39
	RESULTADOS.....	39
	DISCUSSÃO.....	42
	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	46

<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>51</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
	ANEXO A – Protocolo do teste de embriotoxicidade das soluções de desidratação e vitrificação.....	58
	ANEXO B – Protocolo de vitrificação de embriões de camundongo em macro e microvolume.....	61

## 1 INTRODUÇÃO

Após a segunda guerra mundial a difusão do emprego do sêmen congelado na inseminação artificial em animais, permitiu a organização da cadeia de frio utilizando nitrogênio líquido. Os experimentos envolvendo embriões mamíferos proporcionaram, em 1972, os primeiros relatos da sobrevivência embrionária após exposição à temperatura de -196°C (WHITTINGHAM; LEIBO; MAZUR, 1972; WILMUT, 1972). As propostas de técnicas alternativas para os procedimentos de resfriamento e aquecimento das amostras embrionárias culminaram com a descrição da vitrificação (LUYET, 1937). O primeiro sucesso na vitrificação foi obtido em embriões de camundongo (RALL; FAHY, 1985). A facilidade e a praticidade da vitrificação quando comparada aos outros procedimentos de crioconservação levaram à realização de experimentos (KULESHOVA; LOPATA, 2002; VAJTA; KUWAYAMA, 2006). Porém, ainda não foram obtidos resultados de sobrevivência embrionária compatíveis com a utilização comercial deste procedimento de crioconservação, pois estes são inconsistentes quando comparados com as taxas de sobrevivência *in vivo e in vitro* alcançadas com os métodos convencionais de congelação de embriões mamíferos (VAJTA; NAGY, 2006).

Várias técnicas foram descritas para vitrificar ovócitos e embriões, com o objetivo de incrementar as velocidades de resfriamento e aquecimento, como por exemplo: o tamanho mínimo da gota (minimum drop size - MDS) (ARAV, 1992); as grades de microscopia eletrônica (electron microscope grids - EM) (MARTINO; SONGSASEN; LEIBO, 1996), palheta aberta e esticada (open-pulled straw - OPS) (VAJTA *et al.*, 1998), nylon em círculo (cryoloop) (LANE; SCHOOLCRAFT; GARDNER, 1999), volume mínimo de congelação (minimum volume cooling - MVC) (HAMAWAKI; KUWAYAMA; HAMANO, 1999), sistema de hemi-palheta (hemi-straw system - HS) (VANDERZWALMEN *et al.*, 2000), micropipeta de vidro (glass micropipette - GMP) (KONG *et al.*, 2000), vitrificação em superfície sólida (solid surface vitrification - SSV) (DINNYÉS *et al.*, 2000), vitmaster (ARAV; ZERON; OCHERETNY, 2000), ponteiros de pipeta Gilson (P10) utilizadas no preparo de géis de eletroforese (gel-loading tips – GL-Tip) (TOMINAGA; HAMADA, 2001), palheta esticada fechada (closed-pulled straw - CPS) (CHEN *et al.*, 2001), malha de nylon (nylon mesh) (MATSUMOTO *et al.*, 2001), pipeta flexpet de desnudação (flexipet denuding pipette - FDP) (LIEBERMANN *et al.*, 2002a), palheta esticada lacrada (sealed

open pulled straw - mOPS) (LÓPEZ-BÉJAR; LÓPEZ-GATIUS, 2002), palheta esticada aberta super fina (super-fine open-pulled straw - SOPS) (ISACHENKO *et al.*, 2003), micropipeta plástica de diâmetro fino (fine diameter plastic micropipette) (CREMADES *et al.*, 2004), ponteira de 100  $\mu$ L (100  $\mu$ L pipetting tip) (HREDZAK *et al.*, 2005), cryoTip (KUWAYAMA *et al.*, 2005), cryotop (KUWAYAMA *et al.*, 2005) e palheta metálica inoxidável (BUNN *et al.*, 2006).

No laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da UFRGS, nos últimos vinte e três anos, foram realizados diferentes experimentos, com o objetivo de proporcionar taxas de sobrevivência embrionária compatíveis com o emprego comercial da vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* (VIEIRA *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, procurou-se adequar uma técnica utilizando macrovolume para vitrificar embriões de camundongo (COSTA, 2007). A viabilização do emprego de palhetas (0,25 mL) para o envase dos embriões na vitrificação, facilitará o procedimento de transferência destes para as fêmeas receptoras, reduzindo a necessidade de manipulá-los. Além disso, o emprego da palheta é uma garantia da efetiva identificação dos embriões e da qualidade sanitária do processo, assim como a redução da probabilidade de desvitrificação no momento da manipulação. O objetivo destes experimentos foi determinar a taxa de sobrevivência embrionária após vitrificação em macrovolume (palheta de 0,25 mL), na presença de uma haste de ouro, empregando-se soluções crioprotetoras descritas para serem utilizadas com microvolume.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Histórico

Em 1983 se iniciou no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da UFRGS a rotina de experimentos de crioconservação de embriões mamíferos (GREGORY; RODRIGUES, 1985). Primeiramente, utilizou-se a curva rápida (0,3°C/min) com imersão dos embriões bovinos em nitrogênio líquido aos -35°C (RODRIGUES; GREGORY, 1986). Ao mesmo tempo, Andrade e Rodrigues (1987) realizaram ensaios utilizando a curva de congelação rápida em etapas, sendo os embriões de camundongo expostos à solução crioprotetora composta por 1 M glicerol (GLY) por 10 min. Após, os embriões foram expostos à solução que continha 1,5 M GLY + 0,25 M sacarose e 1,5 M GLY + 0,5 M sacarose e em seguida envasados em grupos de 10 a 20 embriões nas palhetas de 0,25 mL, permanecendo a 4°C por 20 min. Posteriormente, transferidos para -7°C por 10 min para a realização da indução da cristalização (*seeding*), e então transferidos para -30°C durante 30 min e imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido. As taxas de viabilidade embrionária foram de 30% (37/124) para os congelados na solução com 0,25 M de sacarose e de 32% (42/130) para os congelados com 0,5 M de sacarose.

Lopes e Rodrigues (1988) e (1991) realizaram experimentos vitrificando mórulas, blastocistos iniciais e blastocistos de camundongo, utilizando a solução crioprotetora composta por 25% GLY + 25% 1,2-propanediol (PROH) em solução salina fosfatada tamponada modificada (PBSm). Após o descongelamento e cultivo *in vitro* por 1 h, o percentual de embriões classificados com base em critérios morfológicos foi de 68,0% (54/80) para mórula, 46,0% (37/80) para blastocisto jovem e 26% (21/80) para blastocisto. A taxa de sobrevivência *in vivo* (implantações) foi de 47,0% (22/47), 37,0% (11/30) e 19,0% (4/21), respectivamente.

Em outro experimento, Palha, Lopes e Rodrigues (1991) verificaram a influência do tempo de equilíbrio na vitrificação de mórulas compactas e blastocistos de camundongo, expondo os embriões à solução crioprotetora composta por 10% GLY + 20% PROH por 5 ou 10 min. Após a exposição, os embriões foram transferidos para a solução que continha 25% GLY + 25% PROH, envasados em palhetas e imediatamente imersos em nitrogênio líquido. Após o aquecimento, os embriões foram expostos à solução de 1 M de sacarose e cultivados por 1 h, sendo posteriormente transferidos para

fêmeas receptoras. As taxas de sobrevivência *in vivo* (fetos) não apresentaram diferenças significativas entre os tempos de exposição à solução crioprotetora, assim como entre os estádios de desenvolvimento utilizados. As mórulas, quando expostas à solução por 5 ou 10 min, desenvolveram-se em fetos em 38,0% (5/13) e 31,0% (5/16), respectivamente. As taxas de desenvolvimento dos blastocistos em fetos após transferência foram de 17,0% (2/12) e 47,0% (8/17), respectivamente.

Hotzel e Rodrigues (1992) avaliaram as taxas de sobrevivência *in vivo* dos blastocistos murinos vitrificados após 30 seg de equilíbrio na solução de vitrificação, desidratados por diferentes períodos, a 20°C, na solução crioprotetora composta por 10% de GLY e 10% de PROH. A desidratação por 15 min foi mais eficiente, proporcionando o desenvolvimento dos embriões em fetos em 41,0% (17/41), quando comparado aos 18,0% (8/20), 8,0% (3/38), 7,0% (2/29) observados após 20, 25 e 30 min de exposição à solução de desidratação.

Aguiar *et al.* (1997) modificaram a composição e a concentração dos constituintes da solução crioprotetora vitrificando mórulas e blastocistos de camundongo, após a exposição a 9,0 M de etilenoglicol (EG) + 6% de albumina sérica bovina (BSA) em PBSm. Os embriões foram previamente desidratados em 1,8 M ou 4,5 M por 90 seg. A taxa de sobrevivência embrionária *in vivo* (fetos) foi de 26,0% (14/53) e 30,0% (18/60), respectivamente, não revelando diferenças entre mórulas e blastocistos.

Côrtes e Rodrigues (2000) realizaram três experimentos avaliando a taxa de sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de blastocistos de camundongo vitrificados na solução que continha 9,0 M de EG, realizando a adição do crioprotetor em uma ou em duas etapas com prévia desidratação (1,8 M EG por 2 min), com ou sem 0,3 M de sacarose, envasados em palhetas de 0,25 mL. As taxas de eclosão foram maiores nos grupos previamente desidratados, 49,0% (19/39) e 40,0% (14/40), respectivamente. A transferência dos embriões vitrificados proporcionou taxas de implantação de 37,0% (26/70) e 32,0% (23/71), não havendo influência da sacarose.

Bertolini, Lange e Rodrigues (2005) avaliaram a sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de mórulas e blastocistos de camundongo após vitrificação em 6,12 M de GLY com prévia desidratação. Os resultados mostraram que as taxas de sobrevivência *in vitro* independentemente do estágio de desenvolvimento embrionário, não foram afetadas pelas concentrações e tempos de equilíbrio. Na avaliação *in vivo*, as mórulas compactas vitrificadas proporcionaram taxas de sobrevivência (fetos) de 27,0% (14/51), não

diferindo do grupo controle (embriões recém coletados) 33,0% (19/58). Por outro lado, a transferência dos blastocistos resultou em menor número de fetos (9,0% - 5/56) em relação ao grupo controle (52,0% - 34/66).

Assaf *et al.* (2007) avaliaram a taxa de eclosão de embriões de camundongo vitrificados em diferentes volumes de 9 M de EG. No experimento 1, os embriões foram distribuídos em 4 tratamentos. Tratamento 1 (T1): grupo controle; tratamento 2 (T2): os embriões foram expostos à solução de 10% GLY + 0,4% BSA, envasados em palhetas de 0,25 mL e submetidos ao congelamento pelo método rápido em Biocool®; tratamento 3 (T3): os embriões foram expostos durante 2 min à solução de desidratação (10% EG + 6% BSA) e posteriormente, transferidos para a solução de vitrificação (50% EG + 6% BSA), onde permaneceram por 30 seg, sendo após transferidos para o volume de 1 µL no interior de um fio de teflon (0,4 mm de diâmetro, 2 cm de comprimento e 0,05 mm de espessura). Os fios foram acondicionados em uma caixa de aço inoxidável para serem armazenados em nitrogênio líquido; Tratamento 4 (T4): os embriões foram expostos à mesma solução de desidratação e vitrificação e colocados em volume de 1µL no interior do fio de teflon. Os fios de teflon foram estocados em globetes unidos às raques e mantidos em nitrogênio líquido. As taxas de eclosão observadas foram: T1=79,80% (245/307); T2=40,07% (117/292); T3=39,13% (54/138); T4=25,69% (37/144). No experimento 2, os autores também avaliaram a taxa de eclosão dos embriões após vitrificação. Os embriões foram distribuídos em 3 tratamentos. T1: grupo controle; T2: os embriões foram expostos à solução de 10% GLY + 0,4% BSA, envasados nas palhetas e submetidos ao congelamento rápido; T3: os embriões foram expostos durante 2 min à mesma solução de desidratação do experimento 1 e então transferidos para tubos eppendorf de 2 mL, contendo a mesma solução de vitrificação. As taxas de eclosão foram de 88,75% (71/80) no T1, 42,22% (141/334) no T2 e 19,82% (66/333) no T3.

No laboratório, são também realizadas como rotina, desde 1995 a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro* (OLIVEIRA; RODRIGUES; NIEMANN, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2003). A busca por maiores taxas de sobrevivência embrionária estimulou o delineamento de experimentos empregando microvolumes da solução crioprotetora. Vieira *et al.* (2006) avaliaram a sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos produzidos por diferentes protocolos variando a fonte protéica: soro de vaca em estro (SVE) ou soro de égua em estro (SEE). Os blastocistos expandidos foram vitrificados em GMP e a taxa de eclosão foi maior no

grupo produzido com meio suplementado com SVE (76,0% - 44/58), quando comparado ao grupo de embriões produzidos no meio suplementado com SEE (59,0% - 35/59).

## 2.2 Crioprotetores

A descrição do GLY como um agente crioprotetor permeável (POLGE; SMITH; PARKES, 1949), e a subsequente descoberta e uso do dimetilsulfóxido - Me<sub>2</sub>SO (DMSO) (LOVELOCK; BISHOP, 1959) permitiram que células e tecidos fossem criopreservados.

De acordo com Mazur (1966), na temperatura de -130°C não ocorrem reações físico-químicas celulares, permanecendo as células em um estado de anabiose. O autor ressalta que o problema fundamental da exposição das células a baixas temperaturas não é o armazenamento a -196°C, mas sim a ocorrência de dois fatores letais durante o resfriamento ou aquecimento do sistema: cristalização e o efeito da solução. As lesões produzidas pela cristalização, quando as células são resfriadas a velocidades inadequadas em proporcionar uma eficiente desidratação, ocorrem pela formação dos cristais de gelo intracelulares, que levam à lise das organelas celulares. Por outro lado, a desidratação celular excessiva conduz ao aumento da concentração dos componentes sólidos celulares, levando a uma precipitação, que também culmina com a desorganização estrutural das organelas celulares, fenômeno denominado de efeito da solução.

Posteriormente, foram desenvolvidos diferentes protocolos de criopreservação visando principalmente a modificação da concentração molar dos agentes crioprotetores (MAZUR, 1970). Rall e Fahy (1985) descreveram a primeira solução crioprotetora utilizada para a vitrificação de embriões de camundongo, que continha DMSO, acetamida e PROH como agentes permeáveis, assim como a combinação de uma macromolécula, o polietilenoglicol. De acordo com Mazur e Schneider (1986), os agentes crioprotetores podem exercer efeitos osmóticos dramáticos sobre as células durante sua adição e remoção.

O EG foi utilizado, primeiramente, na congelação de embriões de camundongo e rato (MIYAMOTO; ISHIBASHI, 1978), sendo posteriormente empregado na vitrificação, por ter um peso molecular (62,07) menor que o GLY (92,09), DMSO (78,13) e o PROH (76,09). Além disso, o EG é altamente permeável à membrana das

células embrionárias e apresenta uma baixa toxicidade nas concentrações entre 1,8 e 8,9 M (SOMMERFELD; NIEMANN, 1999). Por outro lado, Kasai *et al.* (1990) relatam que o EG tem ainda importante papel na estabilização da membrana celular durante o processo de vitrificação. Levando em consideração estas propriedades do EG como crioprotetor, diferentes experimentos foram realizados em camundongos (KASAI *et al.*, 1992; ALI; SHELTON, 1993; ZHU *et al.*, 1993; SHAW; WARD; TROUNSON, 1995; AGUIAR *et al.*, 1997; CÔRTEZ; RODRIGUES, 2000; EMILIANI *et al.*, 2000; ASSAF *et al.*, 2007), coelhos (KASAI *et al.*, 1992), ovinos (COCERO *et al.*, 1996), ratos (JIANG; UMEZU; SATO, 1999) e bovinos (DONNAY *et al.*, 1998; SOMMERFELD; NIEMANN, 1999; VIEIRA *et al.*, 2007).

Shaw, Ward e Trounson (1995) observaram que embriões (2- e 4-células) de camundongo podem ser vitrificados em soluções que contém associações de crioprotetores com 1,5 M de PROH e 0,1 M de sacarose, proporcionando taxas de desenvolvimento até blastocistos de 52-72,0% na crioconservação de embriões de 2-células e de 69-97,0% com embriões de 4-células. Em outro estudo, Emiliani *et al.* (2000) obtiveram também resultados na vitrificação de zigotos (1-célula) de camundongo utilizando o PROH. Os autores observaram taxas de sobrevivência embrionária após o aquecimento de 92,0% (70/76), quando comparado com o EG, 60,0% (205/339). Mas por outro lado, dos embriões clivados, 70,0% (47/67) e 85,0% (113/133) chegaram até o estágio de blastocisto expandido com o uso de PROH e EG, respectivamente.

As soluções crioprotetoras utilizadas na vitrificação contém misturas de agentes permeáveis, macromoléculas e carboidratos visando à prevenção de lesões nas membranas celulares durante o resfriamento e o aquecimento. Hotamisligil, Toner e Powers (1996) relataram que os açúcares são capazes de preservar a estrutura e a integridade funcional da membrana. Os aditivos com alto peso molecular como os dissacarídeos (sacarose ou trealose) não penetram a membrana celular, mas podem reduzir significativamente a quantidade de crioprotetor intracelular, levando à minimização do efeito tóxico (LIEBERMANN *et al.*, 2002b). Por esse motivo, de acordo com Kuleshova *et al.* (1999), é justificada a adição de açúcares como a sacarose, glicose, frutose, sorbitol, trealose e rafinose à solução de vitrificação.

Outras macromoléculas como a polivinil-pirrolidona (PVP), polietilenoglicol (PEG), Ficoll e Dextran adicionadas à solução de vitrificação, também proporcionam efeito benéfico ao processo (KASAI *et al.*, 1990; DUMOULIN *et al.*, 1994; O'NEIL *et*

*al.*, 1997; SHAW *et al.*, 1997; KULESHOVA; SHAW; TROUNSON, 2001).

### 2.3 Vitriificação

A vitriificação é definida como a solidificação de uma solução, devido à elevação da viscosidade durante o resfriamento. A vitriificação envolve altas taxas de resfriamento e aquecimento permitindo que a solução aquosa passe diretamente para o estado vítreo sem a formação dos cristais de gelo (FAHY *et al.*, 1984). Rall e Fahy (1985), utilizando este procedimento, relataram o primeiro sucesso na vitriificação de embriões de camundongo. De acordo com Vajta e Nagy (2006), esta técnica pode tornar-se uma alternativa comercialmente viável para a criopreservação de embriões, principalmente pela possibilidade de criopreservar embriões produzidos *in vitro*, que apresentam maior sensibilidade à exposição a baixas temperaturas (WURTH *et al.*, 1994, VAJTA; NAGY, 2006).

A vitriificação das células pode ser obtida pelo aumento da velocidade de resfriamento e pelo aumento da concentração das soluções crioprotetoras. Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de alcançar o estado vítreo com a utilização de macrovolumes (250 µL) ou microvolumes (<1 µL) da solução crioprotetora. Esses procedimentos permitem que altas velocidades de resfriamento sejam alcançadas visando aumentar a viabilidade embrionária (MARTINO; SONGSASEN; LEIBO, 1996; VAJTA *et al.*, 1997; ARAV; ZERON, 1997).

#### 2.3.1 Macrovolume

As técnicas de criopreservação como a congelação ultra-rápida e a vitriificação usualmente têm utilizado a imersão direta das palhetas convencionais de 0,25 mL ou criotubos no nitrogênio líquido, com o propósito de aumentar a velocidade de resfriamento (VAJTA; NAGY, 2006). Rall e Fahy (1985) utilizaram palhetas na vitriificação de embriões de camundongo expostos a soluções crioprotetoras altamente concentradas. As velocidades de resfriamento e aquecimento na vitriificação em macrovolume com a utilização das palhetas, foram estimadas em aproximadamente 2.550°C/min e 2.438°C/min entre -25°C e -175°C (PALASZ; MAPLETOFT, 1996; VAJTA *et al.*, 1998), sendo menores com o emprego de criotubos (VAJTA; NAGY, 2006).

A utilização das palhetas como sistema fechado na vitrificação apresenta desvantagens, como por exemplo, as rápidas velocidades atingidas durante os processos de resfriamento e aquecimento, induzem mudanças de pressão, podendo ocasionar o rompimento ou a explosão das palhetas, o que levaria à perda dos embriões (VAJTA; NAGY, 2006).

Posteriormente, com o propósito de evitar alterações bruscas de pressão, as palhetas eram resfriadas em vapor de nitrogênio e logo imersas lentamente em nitrogênio líquido. No aquecimento, as palhetas eram expostas por 10 seg em ar e transferidas para banho-maria a 37-39°C (KASAI, 1996). De acordo com Vajta e Nagy (2006), estes procedimentos de manipulação resultaram na redução das lesões embrionárias após a vitrificação.

Uma palheta de metal inoxidável foi testada por Bunn *et al.* (2006) na vitrificação de ovócitos bovinos imaturos. Cinco a seis ovócitos foram expostos às soluções de desidração (SD:10% EG + 10% DMSO ) e de vitrificação (SV100%: 20% EG + 20% DMSO + 0,5 M sacarose; SV75%: 15% EG + 15% DMSO + 0,375 M sacarose e SV50%:10% EG + 10% DMSO + 0,25 M sacarose), envasados na palheta metálica e mergulhados em nitrogênio ultra-resfriado (-210°C). Após o aquecimento, os ovócitos foram maturados e fecundados, sendo observadas as seguintes taxas de clivagem: 39,2% (73/187) com a SV100%, 31,0% (58/187) com a SV75%, 11,7% (17/146) com a SV50% e 87,0% (164/189) com o grupo controle dos ovócitos não submetidos à vitrificação. As taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto foram de 10,1% (18/187), 7,6% (14/187), 0,5% (1/146) e 38,0% (71/189), respectivamente.

Amaral *et al.* (2006) avaliaram duas soluções crioprotetoras (20% EG + 20% DMSO + 0,5 M sacarose e 20% EG + 20% PROH + 0,5 M sacarose) na vitrificação de mórulas de camundongo utilizando as palhetas de 0,25 mL (10 mórulas/palheta), previamente desidratadas na metade das concentrações. As taxas de blastocistos verificadas após 48 h de cultivo *in vitro* seguida à vitrificação foram de 96,8% (121/126) para o grupo controle, 83,3% (109/131) para o grupo de DMSO e 81,5% (106/131) para o grupo de mórulas vitrificadas com o PROH.

Finalmente, Costa (2007), conduziu um experimento vitrificando blastocistos murinos após 2 min de desidratação na solução de PBSm + 0,4% de BSA + 10% EG + 10% PROH, seguido da exposição por 25 seg à SV composta por PBSm + 0,4% de BSA + 20% EG + 20% PROH. Os embriões eram envasados em palhetas de 0,25 mL,

que foram seladas com o auxílio de uma haste de ouro ou com o vedante plástico tradicional. As palhetas contendo os embriões eram então imersas em  $\text{SN}_2$ . Após o aquecimento e cultivo *in vitro* dos embriões, o autor obteve as seguintes taxas de eclosão: 93,0% no grupo controle, 56,0% (86/153) dos embriões envasados nas palhetas com a haste de ouro e 19,0% (26/138) dos embriões envasados de maneira convencional.

### 2.3.2 Microvolume

A redução do volume da solução de vitrificação que contém os ovócitos ou embriões não só oferece o benefício do aumento nas taxas de resfriamento e aquecimento, como também reduz as possibilidades da formação de cristais de gelo ou nucleação (VAJTA; NAGY, 2006).

Landa e Tepla (1990) vitrificaram embriões murinos de 8-células em microgotas (5 a 20  $\mu\text{L}$ ) previamente desidratados em uma solução crioprotetora composta por 10% GLY e posteriormente foram transferidos à solução de vitrificação. Após o aquecimento na solução de 0,5 M de sacarose, 83 a 93,0% dos embriões desenvolveram-se até o estágio de blastocisto. Os autores obtiveram taxas de eclosão de 73,0 a 92,0%, após o cultivo *in vitro* por 48 e 96 horas, respectivamente.

Posteriormente, Arav (1992) desenvolveu uma técnica denominada tamanho mínimo da gota (MDS) para a vitrificação de ovócitos e embriões de suínos e camundongos, onde o volume da gota da solução crioprotetora que continha os embriões era de 0,06  $\mu\text{L}$ . O pequeno volume da amostra permitiu a redução da concentração da solução crioprotetora em 50,0%, porém a sobrevivência embrionária após vitrificação não apresentou resultados favoráveis.

Martino, Songsasen e Leibo *et al.* (1996) desenvolveram um sistema em que os ovócitos bovinos maduros eram colocados em uma gota com volume menor que 1  $\mu\text{L}$  de solução de vitrificação (5,5 M EG + 1,0 M sacarose e 4 M EG + 1,0 M sacarose). A gota era colocada sobre uma grade de microscopia eletrônica (EM) (3,05 mm de diâmetro e 0,037 mm de espessura) que foi imersa em nitrogênio líquido ( $\text{NL}_2$ ) a  $-196^\circ\text{C}$  ou em nitrogênio ultra-resfriado ( $\text{SN}_2$ ) a  $-200^\circ\text{C}$ . Posteriormente, as amostras crioconservadas foram transferidas para um criotubo e armazenadas em nitrogênio líquido. Os autores compararam as taxas de sobrevivência embrionária encontrando melhores resultados com os ovócitos vitrificados nas EM e imersas no  $\text{NL}_2$ , 72,0%



(108/150), em comparação com o grupo de ovócitos imersos no SN<sub>2</sub>, 51,0% (78/154) e com grupo de ovócitos vitrificados nas palhetas convencionais 34,0% (40/117). As taxas de desenvolvimento até blastocistos após fecundação *in vitro* foram 15,0% (23/150), 10,0% (16/154) e 1,0% (1/117), respectivamente. Em relação à concentração da solução crioprotetora (5,5 ou 4 M EG) utilizada para a vitrificação dos ovócitos bovinos, não foram encontradas diferenças estatísticas em relação às taxas de clivagem, com 29,0% (48/167) no grupo vitrificado com 5,5 M EG e 32,0% (61/193) no grupo com 4,0 M EG, assim como, entre as taxas de desenvolvimento embrionário até blastocisto, 10,0% (16/167) e 15,0% (28/193), respectivamente.

Vajta *et al.* (1998) vitrificaram ovócitos e embriões bovinos em diferentes estádios de desenvolvimento (do dia 1 ao dia 7; Dia 0 = dia da fecundação) utilizando palhetas modificadas de 0,25 mL, que denominaram como palhetas abertas esticadas (OPS). Para confeccionar as OPS, as palhetas foram expostas ao calor e esticadas manualmente até obter um diâmetro interno e uma espessura da parede da parte central diminuída de 1,7 a ~0,8 mm, e de 0,15 a ~0,07 mm, respectivamente. O envase dos embriões expostos ao volume de 1 a 2 µL da solução de vitrificação (16,5% EG + 16,5% DMSO + 0,5 M de sacarose) foi realizado por efeito capilar. As velocidades de resfriamento e aquecimento das amostras nas OPS entre -25°C e -175°C foram de 22.500°C/min e entre 0°C e -195°C de 16.700°C/min, enquanto que nas palhetas convencionais utilizadas com macrovolume da solução crioprotetora, as velocidades de resfriamento e aquecimento foram de 2.550°C/min e 2.438°C/min, respectivamente. As taxas de sobrevivência dos blastocistos (dias 6 e 7), avaliadas às 48 e 72 h após o aquecimento, foram de 70,0% (48/69) nas palhetas convencionais e 94,0% (104/111) nas OPS. As taxas de desenvolvimento até o estágio de blastocisto obtidas a partir dos embriões vitrificados em diferentes dias de desenvolvimento, não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

O nylon em círculo (cryoloop) foi outro sistema descrito, por Lane, Schoolcraft e Gardner (1999), para a vitrificação de embriões de camundongo e humanos, que consiste em uma volta de fibra sintética (nylon curvado de 20 µm de comprimento e 0,5–0,7 mm de largura), adaptado a um tubo de aço o qual é inserido na tampa de um criotubo. Os blastocistos foram vitrificados em uma solução de 20% DMSO + 20% EG + 10 mg/mL Ficoll + 0,65 M sacarose, sendo previamente desidratados com a metade das concentrações dos crioprotetores. A taxa de re-expansão dos embriões de camundongo após aquecimento foi de 100% (160/160). Não foram encontradas

diferenças entre as taxas de eclosão dos embriões vitrificados 95,5% (153/160) e a observada no grupo controle 87,5% (140/160), assim como entre as taxas de implantação 78,0% (46/60) e 85,0% (51/60) e no desenvolvimento fetal 55,0% (33/60) e 58,0% (35/60), respectivamente. A vitrificação de embriões humanos nesse sistema proporcionou taxas superiores de eclosão 73,3% (13/18) e implantação 60,0% (11/18) quando comparado ao grupo controle de 63,6% (7/12) e 36,0% (4/16), respectivamente.

Hamawaki, Kuwayama e Hamano (1999) desenvolveram um sistema que denominaram de volume mínimo de congelação (MVC) para a vitrificação de blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, como variação do MDS descrito por Arav (1992). Os autores avaliaram as taxas de sobrevivência embrionária após vitrificação dos embriões em gotas menores que 1  $\mu$ L, envasados em palheta de 0,25 mL (lacrada ou não) e imersos diretamente no nitrogênio. No grupo controle, realizaram a vitrificação dos embriões em gota de 25-30  $\mu$ L, envasados em palheta lacrada. Os embriões foram vitrificados em solução crioprotetora composta por 25% EG + 20% w/v PVP + 20% w/v sacarose em PBS, sendo previamente desidratados pela exposição à solução de 25% EG + 3 mg/mL PVP em PBS por 10 min. Os autores avaliaram o efeito do aquecimento das palhetas em banho maria a 37°C com ou sem prévia exposição ao ar por 10 seg. As maiores taxas de sobrevivência embrionária após vitrificação foram obtidas nos grupos dos embriões vitrificados com 1  $\mu$ L da solução com as palhetas lacradas, 75,8% (25/33) e 71,9% (23/32) com as palhetas não lacradas, que foram aquecidos sem exposição ao ar. Os resultados obtidos com a vitrificação dos embriões contidos em volume de 25  $\mu$ L diferiram estatisticamente, proporcionando taxas de sobrevivência embrionária de 56,7% (17/30) para os aquecidos sem exposição ao ar e 28,9% (11/38) para os aquecidos com a exposição ao ar.

Posteriormente, Vanderzwalmen *et al.* (2000) utilizaram palheta de 0,25 mL seccionada ao meio, o que denominaram hemi-palheta (HS) para a vitrificação de ovócitos em metáfase II (MII) e blastocistos humanos utilizando 15% EG + 15% DMSO por 15 seg, previamente desidratados por 2 min em solução contendo a metade dessas concentrações. Após o processo de vitrificação, as HS foram colocadas dentro da palheta de 0,5 mL para o armazenamento. A taxa de clivagem obtida a partir da fecundação dos ovócitos vitrificados nas HS foi de 52,0% (10/19). No grupo dos blastocistos vitrificados, os autores obtiveram taxas de expansão de 88,0% (14/16) e 44,0% (7/16) de eclosão.

Vajta *et al.* (1998) demonstraram que a vitrificação com o emprego da OPS,

pelas suas reduzidas dimensões, proporcionava aumento das velocidades de resfriamento e aquecimento do sistema. A sublimação do nitrogênio líquido no momento da imersão da OPS faz com que um espaço vazio seja formado entre a parede da OPS e o nitrogênio líquido, o que pode levar a uma desaceleração do processo. Kong *et al.* (2000), para tentar minimizar o problema, utilizaram as denominadas micropipetas de vidro (GMP), levando-se em consideração que o vidro apresenta maior massa (0,0984 g) quando comparado ao plástico das OPS (0,070 g). O volume da solução crioprotetora é reduzido (0,14  $\mu$ L e 2,68  $\mu$ L) devido ao menor diâmetro, o que poderia alcançar maiores velocidades de resfriamento. Os autores avaliaram as taxas de sobrevivência embrionária de blastocistos murinos vitrificados nas OPS ou nas GMP, assim como, o número de embriões vitrificados por GMP e o tipo de envase da solução com o embrião na coluna das GMP. A vitrificação dos embriões foi realizada utilizando a solução crioprotetora composta por 16,5% de EG + 16,5% de DMSO + 0,5 M de sacarose, onde os embriões foram previamente desidratados na solução de 10% EG + 10% DMSO por 1 min. Os resultados não revelaram diferenças entre as taxas de re-expansão dos embriões vitrificados nas OPS, de 93,5% (58/62) e nas GMP, de 95,0% (57/60). Resultados semelhantes foram observados nas taxas de eclosão de 88,7% (55/62) dos embriões envasados nas OPS e 90,0% (54/60) dos envasados nas GMP. O número de embriões envasados nas GMP influenciou a taxa de re-expansão. No envase de 2 ou 4 embriões por GMP, 100% (20/20 e 40/40) re-expandiram após o aquecimento. Por outro lado, nas GMP que receberam 6, 8, ou 10 embriões, as taxas de re-expansão foram de 93,7% (44/48), 78,1% (50/64) e 63,7% (51/80), respectivamente. Os autores também encontraram diferenças significativas em relação ao efeito do volume da solução contendo os embriões envasados nas GMP. O volume menor, ocupando somente a parte estreita do capilar, proporcionou 100% (40/40) de re-expansão, diferente dos 85,0% (34/40) observados quando um maior volume era envasado, ocupando também a parte mais larga do capilar.

Em outro estudo, Cho *et al.* (2002) determinaram a taxa de sobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vitro* vitrificados nas GMP ou nas OPS. A solução crioprotetora utilizada continha 16,5% de EG + 16,5% de DMSO + 0,5 M de sacarose, sendo os embriões previamente desidratados na solução de 10% EG + 10% DMSO por 1 min. Os autores também avaliaram o efeito da localização dos embriões dentro das GMP na vitrificação. Os embriões vitrificados nas GMP atingiram maiores taxas de re-expansão, de 90,4% (57/63), e de eclosão, de 57,1% (36/63) diferindo estatisticamente,

quando comparados aos vitrificados nas OPS, de 79,6 (43/54) e 51,8% (28/54), respectivamente. Os embriões envasados na parte estreita da GMP sobreviveram em maior percentual (83,0% - 25/30), provavelmente, devido ao menor volume, quando comparados ao percentual de sobrevivência dos embriões vitrificados na parte larga da GMP, de 56,0% (17/30).

Dinnyés *et al.* (2000) propuseram o sistema que denominaram vitrificação em superfície sólida (SSV) como uma variação do sistema desenvolvido por Landa e Tepla (1990) realizando o pré-resfriamento das gotas de 1-2  $\mu$ L na superfície sólida a  $-150^{\circ}\text{C}$  e  $-180^{\circ}\text{C}$ , para a vitrificação de ovócitos bovinos. Os ovócitos foram expostos à solução crioprotetora que continha 35% EG + 5% PVP + 0,4 M trealose em TCM 199 + 20% soro fetal bovino (SFB), sendo previamente equilibrados na solução de 4% EG por 12-15 min. Os ovócitos (com e sem células do cúmulus) após o aquecimento foram submetidos à ativação partenogenética, à fecundação *in vitro* ou à transferência nuclear. A taxa de sobrevivência dos ovócitos ativados partenogeneticamente após aquecimento foi de 86,0% (36/42) para os vitrificados com células do cumulus e de 79,0% (54/68) para os sem as células do cúmulus, o que resultou em taxas de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto expandido ou eclodido de 8,0% (3/42) e 3,0% (2/68), respectivamente, não diferindo estatisticamente do grupo controle (15,0% - 7/47). As taxas de desenvolvimento dos ovócitos vitrificados e fecundados *in vitro* ao estágio de blastocisto foi de 12,0% (21/175), não diferindo do grupo controle (19,0% - 18/98). No grupo dos ovócitos vitrificados que foram utilizados como carioplastos na transferência nuclear, os autores obtiveram 20,0% (21/106) de taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, o que não diferiu do grupo com ovócitos frescos (22,0% - 23/106).

Tominaga e Hamada (2001) avaliaram o envase dos embriões em ponteiras de pipeta Gilson (P10), cortadas nas extremidades (~10-15 mm) utilizadas no preparo de géis de eletroforese (“gel-loading tips” - GL-Tip) para a vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* em vários estádios de desenvolvimento (do dia 1 ao dia 7; Dia 0 = dia da fecundação). Os embriões foram previamente desidratados na solução de 10% EG + 10% DMSO por 2 min e em seguida expostos à solução de vitrificação que continha 20% EG + 20% DMSO + 0,6 M sacarose por 30 seg. Os embriões foram aspirados nas GL-Tip em um volume de 0,6-0,7  $\mu$ L e, imediatamente, mergulhados em nitrogênio líquido. Posteriormente, as GL-Tip foram colocadas dentro da palheta de 0,5 mL para serem armazenadas. Os resultados não revelaram diferenças estatísticas entre

as taxas de desenvolvimento até blastocisto dos embriões do grupo controle (embriões frescos) e vitrificados nos diferentes estádios: Dia 1: 70,5% (31/44) e 58,0% (29/50); Dia 2: 75,9% (22/29) e 68,3% (28/41); Dia 3: 75,9% (22/29) e 57,9 (22/38); Dia 4: 80,0% (20/25) e 67,6% (23/34)]; Dia 5: 82,1% (23/28) e 60,0% (21/35); Dia 7: 100% (46/46) e 97,8% (45/46).

Chen *et al.* (2001) desenvolveram um sistema que denominaram palheta esticada fechada (CPS) para a vitrificação de ovócitos de camundongo. Os autores avaliaram a sobrevivência de ovócitos maduros após vitrificação nos sistemas de CPS, palhetas (0,25 mL), OPS e EM. Os ovócitos foram previamente desidratados na solução de 1,5 M de EG por 5 min e imediatamente transferidos para gotas de 200  $\mu$ L da solução de vitrificação (5,5 M EG + 1 M sacarose). As extremidades das CPS foram preenchidas com 2 mm da solução de vitrificação, 2 mm de ar, 2 mm da solução de vitrificação contendo os ovócitos, 2 mm de ar e 2 mm da solução de vitrificação. As taxas de sobrevivência dos ovócitos, representadas pelo desenvolvimento até o estágio de blastocisto após a fecundação foram de 79,0% (215/273) nas CPS e 77,0% (198/257) nas palhetas, 63,0% (171/271) nas OPS e 39,0% (141/362) nas EM.

Matsumoto *et al.* (2001) desenvolveram um sistema para a vitrificação de ovócitos bovinos imaturos que denominaram malha de nylon (nylon mesh), como variação da EM desenvolvida por Martino, Songsasen e Leibo (1996). Os complexos cumulus ovócito (COC) em grupos de 10 a 20 ou 40 a 65 foram colocados sobre a malha em forma de triângulo (1 cm de base e 3 cm de altura) adaptado a um suporte de nylon de 60  $\mu$ m de tamanho. Os autores avaliaram as taxas de desenvolvimento embrionário de ovócitos vitrificados na malha de nylon e EM, expondo-os à solução de vitrificação 40% EG + 18% Ficoll-70 + 0,3 M sacarose. A vitrificação do grupo contendo 40-65 ovócitos proporcionou 3,0% (16/470) de desenvolvimento embrionário até o estágio de 8-células. Os autores observaram 2,0% (2/98) quando foram vitrificados 10-20 ovócitos na malha de nylon.

Liebermann *et al.* (2002a) desenvolveram um sistema que denominaram pipeta flexpet de desnudação (FDP), para a vitrificação de embriões humanos (zigotos anormais com 1 pronúcleo - PN ou 3 PN). Os zigotos foram, previamente, desidratados em uma solução de 1,5 M EG por 5 min e imediatamente expostos à solução de vitrificação que continha 5,5 M EG + 1 M sacarose por 60 seg, envasados por capilaridade nas FDP (~2  $\mu$ L), que eram mergulhadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, acondicionadas em criotubos para o armazenamento nos botijões

criogênicos. A vitrificação dos embriões nas FDP proporcionou taxas de sobrevivência embrionária após o processo da vitrificação de 88,0% (190/217) e clivagem de 77,0% (147/190), sendo inferior ao grupo controle, com 85,0% (115/136) de embriões clivados. Não foram encontradas diferenças nas taxas de clivagem e blastocistos em relação ao grupo controle nos ovócitos vitrificados com 1 e 3 PN nos embriões 2-células.

López-Béjar e López-Gatius (2002) avaliaram as OPS com uma modificação, que denominaram de palheta esticada lacrada (mOPS) para a vitrificação de embriões de coelho nos diferentes estádios de desenvolvimento (mórula, mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto). O fechamento das mOPS foi realizado colocando-se uma tampa de algodão na extremidade da palheta com diâmetro maior e com álcool polivinílico (PVA) no diâmetro menor. O envase dos embriões nas mOPS foi feito entre duas colunas da solução crioprotetora separadas por bolhas de ar. Os autores avaliaram duas soluções crioprotetoras compostas por 25% GLY + 25% EG e 25% EG + 0,25 M sacarose na vitrificação dos embriões utilizando as mOPS e palhetas (0,25 mL). As taxas de sobrevivência embrionária *in vitro* utilizando a primeira solução crioprotetora foram maiores nas mOPS (89,5% - 376/420) do que nas palhetas (81,2% - 345/425). Resultados similares de sobrevivência embrionária foram obtidos quando utilizaram a segunda solução de vitrificação, 86,8% (369/425) nas mOPS e 76,5% (325/425) nas palhetas. Os autores também avaliaram a viabilidade *in vivo* dos blastocistos após vitrificação nas mOPS. Um grupo de seis a sete embriões foi transferido por corno uterino das receptoras e não foi observada diferença no percentual de láparos nascidos entre o grupo de embriões vitrificados nas mOPS (51,0% - 123/238) e o grupo controle (58,5% - (131/224).

Isachenko *et al.* (2003) desenvolveram um sistema que denominaram palheta esticada aberta superfina (SOPS) para a vitrificação de embriões de rato no procedimento de dupla vitrificação. Os embriões foram coletados no estádio de mórula e vitrificados na solução crioprotetora que continha 40% EG + 0,75 M sacarose + 20% FCS por 20 seg. Após o aquecimento, as mórulas foram cultivadas até atingir os estádios de blastocistos iniciais (BI), blastocistos (BL) e blastocistos expandidos (BX) para serem submetidos novamente ao processo de vitrificação. A taxa de sobrevivência das mórulas vitrificadas foi de 81,0% (290/358). As taxas de sobrevivência dos embriões submetidos à dupla vitrificação foram 83,0% (72/87) para BI, 34,0% (31/93) para B e 76,0% (55/73) para BE.

Outro sistema de vitrificação utilizando as ponteiros de pipetas foi o desenvolvido por Cremades *et al.* (2004) que era composto por uma micropipeta plástica de diâmetro fino para a vitrificação de mórulas compactas e blastocistos iniciais humanos. Os embriões foram desidratados na solução de 7,5% EG + 7,5% DMSO por 3 min e, posteriormente, expostos à solução crioprotetora que continha 16,5% EG + 16,5% DMSO + 0,67 M sacarose por 25 seg. De um a dois embriões foram aspirados nas ponteiros (0,36 mm diâmetro interno) das pipetas de 0,1 – 1,0  $\mu$ L no volume de 0,5  $\mu$ L. As ponteiros foram expostas ao vapor de nitrogênio líquido por 2 min, colocadas dentro de criotubos (3,6 mL) pré-resfriados e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido. A vitrificação das mórulas compactas e dos blastocistos iniciais proporcionaram taxas de re-expansão de 73,0% (22/30) e 82,0% (27/33), respectivamente.

Hredzak *et al.* (2005) desenvolveram um sistema para a vitrificação de embriões humanos produzidos por fecundação *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoíde (ICSI), utilizando as ponteiros de 100  $\mu$ L. Os embriões foram expostos à solução de vitrificação que continha 40% EG + 1 M sacarose. Após o aquecimento, os embriões foram cultivados *in vitro* por 24 h e os autores avaliaram as taxas de re-expansão embrionária, sendo de 69,8% nos embriões produzidos por FIV e de 48,0% naqueles produzidos por ICSI. As taxas de gestação obtidas foram de 19,0% para FIV e 27,6% para ICSI.

Kuwayama *et al.* (2005) desenvolveram dois sistemas que denominaram “CryoTip” e “Cryotop” para a vitrificação de embriões humanos. O CryoTip consiste em uma palheta com uma parte fina (250  $\mu$ m diâmetro interno  $\times$  20  $\mu$ m espessura da parede  $\times$  3 cm de comprimento) conectado a uma parte espessa (2000  $\mu$ m diâmetro interno  $\times$  150  $\mu$ m espessura da parede  $\times$  4,5 cm de comprimento) adaptada a um protetor de metal removível. Os embriões foram envasados em 1  $\mu$ L da solução dentro da parte estreita do CryoTip. Posteriormente, a palheta foi lacrada nos dois extremos por calor e mergulhada em nitrogênio líquido. O sistema do Cryotop consiste em uma tira de polipropileno (0,4 mm de largura  $\times$  20 mm de comprimento  $\times$  0,1 mm de espessura) adaptada a uma palheta. Os embriões foram envasados em volume menor que 0,1  $\mu$ L da solução dentro do Cryotop e mergulhado em nitrogênio líquido. As taxas de sobrevivência dos embriões vitrificados nos dois sistemas não apresentaram diferenças, sendo para o Cryotop de 97,0% (221/227) e de 93,0% (82/88) para o CryoTip. As taxas de gestação foram de 59,0% (131/221) e 51,0% (42/82) e as de parto de 51,0% (113/221) e 48,0% (39/82), respectivamente.

### 3. ARTIGO

#### SOBREVIVÊNCIA *IN VITRO* DE BLASTOCISTOS *Mus domesticus domesticus* VITRIFICADOS EM MACRO OU MICROVOLUME DE CRIOPROTETOR

Alexander Nivia Osuna<sup>1</sup>, Daniela Scherer da Silva<sup>1</sup>, Paula Rodriguez Villamil<sup>1</sup>,  
Artur Emilio Freitas e Silva<sup>1</sup>, Felipe Ongaratto<sup>2</sup>, José Luiz Rodrigues<sup>3</sup>

Dissertação de Mestrado  
Autor: Alexander Nivia Osuna  
Orientador: José Luiz Rodrigues

#### RESUMO

O desenvolvimento de protocolos eficientes para a vitrificação de embriões mamíferos ainda é um desafio para os especialistas em reprodução. Soluções crioprotetoras de baixa toxicidade associadas a técnicas seguras de envase são fatores fundamentais, para proporcionarem uma eficiente identificação e controle sanitário das amostras. Dois experimentos foram realizados para determinar a taxa de sobrevivência de embriões *Mus domesticus domesticus* envasados em palhetas convencionais (0,25 mL), na presença de uma haste metálica de ouro, empregando soluções crioprotetoras descritas para a vitrificação em microvolume. No experimento 1, avaliou-se a toxicidade da solução de desidratação (SD: PBSm + 10% EG + 10% PROH + 0,5 M sacarose), expondo os embriões por diferentes tempos: 1 (T1), 3 (T2) ou 10 min (T3). A toxicidade da solução de vitrificação (SV: PBSm + 20% EG + 20% PROH) foi determinada pela exposição dos embriões durante 25, 60 ou 180 seg, previamente desidratados por 1 ou 3 min. No experimento 2, avaliou-se a utilização do macrovolume (palhetas com a haste de ouro) e microvolume (micropipetas de vidro - GMP) na vitrificação dos blastocistos expostos à SV por 25 seg, previamente desidratados por 1 ou 3 min. Os dados foram analisados pelo teste Qui-Quadrado ( $P < 0,05$ ). No experimento 1, não foi observada diferença estatística entre as taxas de eclosão dos embriões desidratados: T1=68,0% (38/56), T2=72,0% (36/50), T3=71,0% (39/55) e o

---

<sup>1</sup> Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS

<sup>2</sup> Graduação em Medicina Veterinária – UFRGS

<sup>3</sup> PhD Professor Titular Departamento de Patologia Clínica Veterinária – FAVET – UFRGS



grupo controle, (74,0% - 48/65). No entanto, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na taxa de eclosão em relação ao tempo de exposição dos embriões à SV. Os embriões desidratados por 1 ou 3 min e expostos à SV por 25 seg proporcionaram maiores taxas de re-expansão (79,0% vs 84,0%) e de eclosão (58,0% vs 72,0%), em relação aos tempos de exposição de 60 e 180 seg. No experimento 2, após a vitrificação dos embriões envasados nas palhetas com a haste de ouro, a taxa de eclosão dos blastocistos previamente desidratados por 1 min foi de 16,0% (10/64) e de 4,0% (2/57) quando previamente desidratados por 3 min. Por outro lado, os embriões envasados nas GMP, e previamente desidratados por 3 min, foram os que apresentaram maior taxa de eclosão (60,0% - 52/86). A vitrificação de embriões utilizando soluções crioprotetoras descritas para microvolume não foi eficiente na crioproteção dos blastocistos envasados em palhetas convencionais com a haste de ouro.

Palavras chaves: vitrificação, blastocisto, murino, macrovolume, microvolume.

## ABSTRACT

### IN VITRO SURVIVAL OF VITRIFIED *Mus domesticus domesticus* BLASTOCYST IN MACRO- OR MICROVOLUME OF CRYOPROTECTANT SOLUTION

Alexander Nivia Osuna<sup>1</sup>, Daniela Scherer da Silva<sup>1</sup>, Paula Rodriguez Villamil<sup>1</sup>,  
Artur Emilio Freitas e Silva<sup>1</sup>, Felipe Ongaratto<sup>2</sup>, José Luiz Rodrigues<sup>3</sup>

*Master's Dissertation*

*Author:* Alexander Nivia Osuna

*Adviser:* José Luiz Rodrigues

*The development of efficient vitrification protocols for mammalian embryos still is a challenge for reproductive biologists. Low toxicity cryoprotectant solutions and safe vitrifications procedures that allow sample identification and sanitary control are fundamental factors. Two experiments were conducted to determine the survival rate of vitrified *Mus domesticus domesticus* embryos loaded into straws containing a metallic piece (manufactured in gold), using cryoprotectant solutions described for microvolume vitrification procedures. In Experiment 1, the toxicity of the dehydration solution (SD: PBSm + 10% EG + 10% PROH + 0,5 M sucrose) was evaluated using three different embryo exposure times: 1 (T1), 3 (T2) or 10 min (T3), in addition as well as the toxicity of the vitrification solution (SV: PBSm + 20% EG + 20% PROH) was also tested upon embryo exposure for 25, 60 or 180 sec, previously dehydration for 1 or 3 min. In Experiment 2, the use of macrovolume (straw with a stem of gold) or microvolume (glass micropipettes – GMP) was evaluated for the vitrification of blastocysts after exposure to SV for 25 sec and previous dehydration for 1 or 3 min. Data were analyzed by the Chi-square test ( $P < 0,05$ ). In Experiment 1, statistical differences were not observed between hatching rates of dehydrated embryos: T1=68.0% (38/56), T2=72.0% (36/50), T3=71.0% (39/55) and control group embryos, (74.0% - 48/65). However, a significant difference ( $P < 0,05$ ) was observed between hatching rates after embryos exposure to the SV. Embryos dehydrated for 1 or 3 min and exposed for 25 sec to the SV showed higher re-expansion (79.0% vs. 84.0%) and hatching rates (58.0% vs. 72.0%) than embryos exposed to SV for 60 or 180 sec. In Experiment 2, after vitrification the embryos loaded into straws containing a metallic piece showed a hatching rate of 16.0% (10/64) when previously dehydrated for 1 min, and 4.0% (2/57) when for 3 min. On the other hand, embryos loaded into GMP, previously dehydrated for 3 min, showed a higher hatching rate, (60.0% - 52/60). Embryo vitrification using a cryoprotectant solution described as suitable for microvolume was not efficient to cryoprotect blastocysts loaded into macrovolume straws containing a metallic piece.*

*Keywords:* vitrification, blastocyst, mouse, macrovolume, microvolume.

---

<sup>1</sup> Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS

<sup>2</sup> Graduação em Medicina Veterinária – UFRGS

<sup>3</sup> PhD Professor Titular Departamento de Patologia Clínica Veterinária – FAVET – UFRGS

## INTRODUÇÃO

Desde os primeiros sucessos alcançados na criopreservação de embriões mamíferos (WHITTINGHAM; LEIBO; MAZUR, 1972 ; WILMUT, 1972), foram descritas metodologias para a simplificação do processo que culminou com a descrição da vitrificação. Rall e Fahy (1985), realizaram o primeiro relato da sobrevivência de embriões murinos crioconservados através desta técnica. A vitrificação é induzida pela exposição a soluções crioprotetoras altamente concentradas ou pelo incremento nas velocidades de resfriamento e aquecimento (VAJTA; KUWAYAMA, 2006). A redução do efeito tóxico da solução crioprotetora sobre a viabilidade embrionária tem sido buscada através do emprego de soluções crioprotetoras de menor concentração (KASAI *et al.*, 1990; KASAI, 1996; PALASZ; MAPLETOFT, 1996; SHAW *et al.*, 1997; VAJTA *et al.*, 1998; KULESHOVA *et al.*, 1999; KULESHOVA; SHAW; TROUNSON, 2001; LIEBERMANN *et al.*, 2002a).

A facilidade e praticidade da vitrificação, permitiu o desenvolvimento de diferentes métodos de envases, que utilizam o macro ou microvolume na tentativa de aumentar a eficiência da vitrificação de ovócitos e embriões (VAJTA; NAGY, 2006). Esta eficiência tem sido atingida pelo incremento nas velocidades de resfriamento e aquecimento. Protocolos com reduzido volume da amostra foram desenvolvidos com este propósito, como por exemplo: a introdução direta das amostras no nitrogênio líquido (LANDA; TEPLA, 1990; ARAV, 1992; MARTINO; SONGSASEN; LEIBO, 1996), sistemas abertos e fechados em palhetas plásticas (VAJTA *et al.*, 1998; VANDERZWALMEN *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001; LÓPEZ-BÉJAR; LÓPEZ-GATIUS, 2002; ISACHENKO *et al.*, 2003a; CREMADES *et al.*, 2004;), micropipetas de vidro (KONG *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2002; VIEIRA *et al.*, 2007), ponteiras de pipetas (TOMINAGA; HAMADA, 2001; LIEBERMANN *et al.*, 2002; HREDZAK *et al.*, 2005). Outra alternativa para aumentar a velocidade de resfriamento, foi a utilização do nitrogênio líquido ultra-resfriado (-210°C) (ARAV; ZERON; OCHERETNY, 2000).

Protocolos que utilizam o macrovolume da solução crioprotetora foram descritos dando ênfase as vantagens que apresentam, como por exemplo, a redução da manipulação embrionária, a melhor identificação dos embriões e um maior controle sanitário do processo (NIBART; MARQUANT-LE GUIENNE; HUMBLLOT, 1998; WRATHALL; SUTMÖLLER, 1998; BIELANSKI, 1998). A utilização do ouro como alternativa para incrementar as velocidades de resfriamento e aquecimento, deve-se a

seu baixo calor específico, o que permite maior transferência do calor (COSTA, 2007).

O crescimento do emprego de embriões bovinos de raças zebuínas produzidos *in vitro*, nos programas de melhoramento genético no Brasil e alguns países asiáticos (THIBIER, 2007), estimula a procura dos pesquisadores por alternativas eficazes para a criopreservação dos embriões supranumerários (VIEIRA *et al.*, 2007).

A análise crítica das técnicas de vitrificação revela que a maioria não confere resultados satisfatórios para o emprego comercial. Levando-se em consideração este argumento o objetivo dos experimentos foi determinar a taxa de sobrevivência *in vitro* de embriões *Mus domesticus domesticus* vitrificados em palhetas (0,25 mL) na presença de uma haste de ouro, utilizando-se uma solução crioprotetora preconizada para microvolume.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Meios e reagentes**

Os reagentes utilizados foram da Sigma (St. Louis, MO, USA), testados para embriões. Os meios e soluções foram preparados usando água purificada pelo sistema Milli-Q synthesis (Millipore, Bedford, MA, USA).

Meio de manutenção (MM): Solução salina fosfatada tamponada modificada (PBSm - phosphate-buffered saline) com pH entre 7,15 e 7,35 e osmolaridade entre 270 e 290 mOsm/Kg, suplementada com 0,4% de albumina sérica bovina (BSA - Bovine Serum Albumin).

Solução de desidratação (SD): composta por 10% etilenoglicol (EG) + 10% 1,2-propanediol (PROH) + 0,5 M sacarose em MM.

Solução de vitrificação (SV): composta por 20% EG + 20% PROH em MM.

Solução de aquecimento (SA): composta por 0,25 M sacarose em MM.

### **Animais**

Animais da espécie *Mus domesticus domesticus*, linhagem Suíça Albina fornecidos pelo biotério da Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde, foram utilizados no experimento. Os machos possuíam idades entre dois e dez meses e capacidade reprodutiva comprovada. As fêmeas tinham entre seis e oito semanas de

idade. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), luminosidade (14 h luz/dia) e ventilação constante. Ração e água foram oferecidos para consumo *ad libitum*.

### **Superovulação**

O tratamento superovulatório foi realizado aplicando-se 10 UI (0,2 mL) de eCG (Equine Chorionic Gonadotropin - Folligon® - Intervet), seguido 46 h depois pela aplicação de 10 UI (0,2 mL) de hCG (Human Chorionic Gonadotropin - Chorulon® - Intervet) via intraperitoneal. Imediatamente após a aplicação do hCG, as fêmeas foram transferidas para as gaiolas dos machos para o acasalamento, onde permaneciam até a manhã seguinte, quando realizava-se a identificação do tampão vaginal, sinal de ocorrência da cópula. A observação do tampão vaginal caracterizava o Dia 1 da prenhez.

### **Coleta dos embriões**

As fêmeas doadoras que apresentaram tampão vaginal foram sacrificadas 96 h depois da aplicação do hCG (Dia 4) através do deslocamento cervical. Os embriões foram coletados mediante a perfusão dos cornos uterinos com 0,2 mL do meio de manutenção. As estruturas embrionárias coletadas de cada fêmea foram lavadas, através da passagem em cinco gotas no mesmo meio e os blastocistos selecionados foram, distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos experimentais.

### **Preparação das micropipetas de vidro (GMP)**

As GMP foram modeladas a partir de tubos capilares de vidro para micro-hematócrito. Os tubos foram expostos ao fogo e estirados com auxílio de uma pinça, até atingir um diâmetro na parte central de aproximadamente 0,3 mm. Após resfriarem, procedia-se o corte utilizando-se uma ponta de diamante. A avaliação das dimensões da GMP era realizada sob lupa estereomicroscópica. As GMP foram lavadas em álcool 70% e esterilizadas em forno de Pasteur.

### **Palhetas com a haste de ouro**

Minipalhetas francesas (0,25 mL, IMV®, L'Aigle, France) foram utilizadas, com a introdução de uma haste de ouro, com o propósito de vedar a palheta e permitir o contato do metal com a solução crioprotetora que continha os embriões.



Figura 1- Minipalheta francesa (0,25 mL, IMV®, L'Aigle, France) com a haste de ouro

## **Experimento 1**

### **Teste de toxicidade**

A embriotoxicidade das soluções crioprotetoras foi testada pela exposição dos blastocistos às soluções de desidratação e vitrificação e posterior cultivo *in vitro*. A determinação das taxas de re-expansão e eclosão embrionária, foi realizada às 72 h do cultivo *in vitro*. As soluções crioprotetoras e aquecimento foram mantidas aquecidas a 37°C.

A: avaliou-se a toxicidade da SD pela exposição dos embriões por 1, 3 ou 10 min.

B: avaliou-se a toxicidade da SV pela exposição dos embriões à SD por 1 min, em seguida à SV por 25, 60 ou 180 seg e finalmente expostos à SA por 5 min.

C: avaliou-se toxicidade da SV pela exposição dos embriões à SD por 3 min, em seguida à SV por 25, 60 ou 180 seg e finalmente expostos à SA por 5 min.

D: avaliou-se a taxa de eclosão dos embriões do grupo controle cultivados *in vitro* após a coleta.

## **Experimento 2**

### **Vitrificação dos embriões**

Os embriões foram vitrificados em macrovolume nas palhetas com a haste de ouro e em microvolume nas GMP em grupos de 9-10 e 4-5 embriões, respectivamente. As soluções crioprotetoras foram mantidas aquecidas a 37°C.

Tratamento 1: os embriões foram expostos à SD por 1 min e transferidos para a SV, após 25 seg, envasados por capilaridade em volume de aproximadamente 2 µL nas GMP. Nas palhetas com a haste de ouro, após a exposição às soluções crioprotetoras, os embriões foram envasados com auxílio de uma seringa (1 mL) em volume de 100 µL, dispostos em duas gotas de meio separados por uma bolha de ar.

Tratamento 2: os embriões foram expostos à SD por 3 min, transferidos para a SV por 25 seg e envasados nas GMP e nas palhetas com a haste de ouro, conforme descrito acima.

Imediatamente após o envase dos embriões, as palhetas com a haste de ouro e as GMP, foram mergulhadas em nitrogênio líquido submetido ao vácuo (ultra-resfriado, 210°C) e armazenadas em botijões de nitrogênio líquido até o aquecimento.

### **Aquecimento dos embriões**

#### **Palhetas com a haste de ouro**

As minipalhetas com a haste de ouro foram aquecidas pela imersão em um tubo Falcon®, que continha 15 mL da SA mantida a 37°C, durante 10 seg (Figura 2). Após, o conteúdo da palheta era expelido em uma gota de 1 mL da mesma solução, à mesma temperatura, onde eram mantidos por 5 min.

#### **GMP**

As GMP foram aquecidas pela imersão em eppendorfs, que continham 2 mL da SA, de maneira similar às palhetas com a haste de ouro, utilizando-se a mesma temperatura e tempos de exposição (Figura 2).

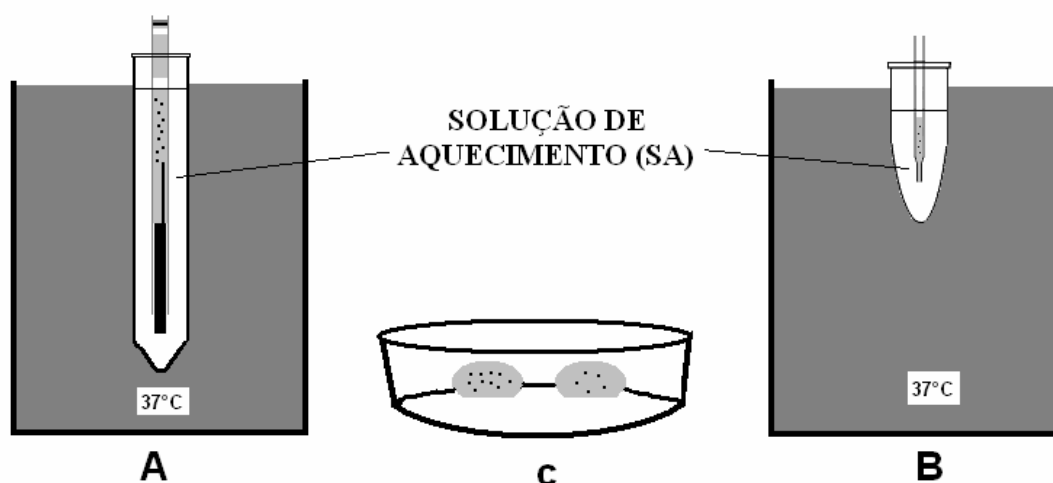


Figura 2 - Técnica de aquecimento dos embriões de camundongo. (A) Minipalhetas com a haste de ouro; (B) GMP; (C) Placa de petri com os embriões

### Cultivo embrionário

Os embriões do grupo controle e dos grupos vitrificados foram cultivados *in vitro* em gotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio KSOM e mantidos em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , 5% de  $\text{O}_2$ , 90% de  $\text{N}_2$  e máxima umidade relativa, durante 72 h. As taxas de re-expansão e eclosão embrionária foram avaliadas às 72 h do cultivo *in vitro*.

### Análise Estatística

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

## RESULTADOS

A toxicidade da SD foi avaliada pela exposição dos embriões durante 1, 3 e 10 min. Os dados da Tabela 1 revelam que não houve diferença entre as taxas de re-expansão e de eclosão dos embriões não expostos (grupo controle) e os expostos à SD.



Tabela 1 - Taxas de re-expansão e eclosão dos embriões de camundongo expostos por diferentes tempos à solução de desidratação (SD)

Tempo de exposição à SD (min)	Blastocistos N	Re-expandidos		Eclodidos	
		N	(%)	N	(%)
Controle	65	-		48	(74)
1	56	45	(80)	38	(68)
3	50	41	(82)	36	(72)
10	55	45	(82)	39	(71)

4 replicações

O teste de toxicidade da solução de vitrificação revelou diferenças na taxa de re-expansão quando os embriões foram desidratados por 1 e após expostos à SV (25, 60 ou 180 seg), proporcionando maiores taxas no grupo de embriões que foi exposto à SV por 25 seg. Em relação às taxas de eclosão, o grupo de embriões expostos à SV por 25 e 60 seg não apresentaram diferenças, porém os valores foram inferiores quando comparado ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2 - Taxas de re-expansão e eclosão dos embriões de camundongo expostos por 1 min à solução de desidratação (SD) e por diferentes tempos na solução de vitrificação (SV)

Tempo de exposição à SV (seg)	N	Re-expandidos		Eclodidos	
		N	(%)	N	(%)
Controle	71	-		53	(75) a
25	53	42	(79) a	31	(58) b
60	53	37	(70) b	29	(55) b
180	46	4	(9) c	1	(2) c

3 replicações

a,b,c: números seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

A exposição dos embriões por 25 seg à SV, previamente desidratados por 3 min na SD, proporcionou maiores taxas de re-expansão e eclosão em comparação às observadas após a exposição por 60 e 180 seg, enquanto que a taxa de eclosão não diferiu do grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Taxas de re-expansão e eclosão dos embriões de camundongo expostos por 3 min à solução de desidratação (SD) e por diferentes tempos na solução de vitrificação (SV)

<i>Tempo de exposição à SV (seg)</i>	<i>N</i>	<i>Re-expandidos</i>		<i>Eclodidos</i>	
		<i>N</i>	<i>(%)</i>	<i>N</i>	<i>(%)</i>
Controle	74	-		55	(74) a
25	43	36	(84) a	31	(72) a
60	52	42	(81) a	25	(48) b
180	42	4	(10) b	4	(10) c

3 replicações

a,b,c: números seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

As Tabelas 4 e 5, mostram que houveram diferenças nas taxas de re-expansão e eclosão entre os grupos experimentais, quando os embriões foram desidratados por 1 e 3 min. Maiores taxas de sobrevivência embrionária foram obtidas no grupo de embriões vitrificados com microvolume nas GMP quando comparado ao macrovolume envasado nas palhetas com a haste de ouro. De maneira similar, foram identificadas diferenças entre a taxa de eclosão do grupo de embriões vitrificados envasados em macro ou microvolume, em relação ao tempo de exposição à SD. O grupo de embriões vitrificados em microvolume nas GMP e previamente desidratados por 3 min revelou maior taxa de eclosão (60,0%), quando comparado com o grupo de embriões desidratados por 1 min (37,0%). Por outro lado, uma maior taxa de eclosão (16,0%) foi observada no grupo de embriões vitrificados com macrovolume nas palhetas com a haste de ouro, que foram previamente desidratados por 1 min em relação aos 4,0% obtidos no grupo previamente desidratado durante 3 min.

Tabela 4 - Taxas de re-expansão e eclosão dos embriões de camundongo vitrificados com macro ou microvolume, previamente expostos por 1 min na solução de desidratação (SD) e 25 seg na solução de vitrificação (SV)

<i>GRUPOS</i>	<i>N</i>	<i>Re-expandidos</i>		<i>Eclodidos</i>	
		<i>N</i>	<i>(%)</i>	<i>N</i>	<i>(%)</i>
Controle	82	-		65	(79) a
Palheta com a haste de ouro	64	14	(22) a	10	(16) b
GMP	68	44	(65) b	25	(37) c

3 replicações

a,b,c: números seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Tabela 5 - Taxas de re-expansão e eclosão dos embriões de camundongo vitrificados com macro ou microvolume, previamente expostos por 3 min na solução de desidratação (SD) e 25 seg na solução de vitrificação (SV)

<i>GRUPOS</i>	<i>N</i>	<i>Re-expandidos</i>		<i>Eclodidos</i>	
		<i>N</i>	<i>(%)</i>	<i>N</i>	<i>(%)</i>
Controle	80	-		64	(80) a
Palheta com a haste de ouro	57	3	(5) a	2	(4) b
GMP	86	58	(67) b	52	(60) c

3 replicações

a,b,c: números seguidos de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

A avaliação do procedimento de manipulação, através da taxa de recuperação dos embriões, durante o procedimento da vitrificação, revelou que o emprego do microvolume com envase nas GMP foi mais eficiente (Tabela 6).

Tabela 6 - Taxa de recuperação dos embriões de camundongo vitrificados com macro e microvolume

<i>GRUPOS</i>	<i>Palheta com a haste de ouro</i>		<i>GMP</i>	
	<i>N</i>	<i>(%)</i>	<i>N</i>	<i>(%)</i>
Aquecidos	175		179	
Recuperados	121	(69) a	154	(86) b

a,b: números seguidos de letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Os mecanismos de toxicidade da solução de vitrificação não foram ainda elucidados, apesar de terem sido realizados diferentes experimentos na tentativa de relacionar os efeitos tóxicos da solução com as suas propriedades físicas (FAHY; LEVY; ALI, 1987; FAHY *et al.*, 1990). Entre os fatores que interagem no procedimento de vitrificação, pode-se considerar a toxicidade das soluções crioprotetoras entre os de maior importância para o emprego eficiente desta técnica de criopreservação (BERTOLINI; LANGE; RODRIGUES, 2005; DINNYÉS *et al.*, 2006). O EG é um dos crioprotetores mais efetivos na criopreservação de embriões de camundongo pela sua baixa toxicidade (KASAI *et al.*, 1990; KASAI *et al.*, 1992; ALI; SHELTON, 1993a;

ALI; SHELTON, 1993b; ZHU *et al.*, 1993; EMILIANI *et al.*, 2000) e a sua rápida difusão através da membrana celular (EMILIANI *et al.*, 2000). Associações de soluções crioprotetoras permeáveis e não permeáveis de baixo peso molecular têm sido utilizadas na vitrificação de embriões, para minimizar o efeito tóxico (VAJTA; KUWAYAMA, 2006). O nosso experimento revelou que a exposição dos embriões à solução crioprotetora composta por EG, PROH, não apresentou efeitos tóxicos em concentrações de até 10%, permitindo a desidratação da célula por períodos de até 10 min sem diminuição da sua viabilidade (Tabela 1), proporcionando taxas de sobrevivência embrionária similares às observadas no grupo controle. Por outro lado, a exposição dos embriões a soluções crioprotetoras mais concentradas, como a SV, requereu um menor tempo de exposição (Tabela 2 e 3). A exposição por períodos mais longos reduziu as taxas de sobrevivência embrionária, provavelmente, em decorrência dos efeitos tóxicos, que podem ter sido agravados pelas diferenças nas concentrações das soluções crioprotetoras. A redução da viabilidade embrionária pode também ter tido como causa a ocorrência de lesões nas membranas das organelas celulares, nas membranas dos blastômeros ou o endurecimento da zona pelúcida.

O processo de vitrificação ocasiona consideráveis danos morfológicos e funcionais aos embriões e ovócitos (VAJTA; HYTTEL; CALLESEN, 1997) e seu efeito depende de fatores como o tamanho e forma da célula, permeabilidade das membranas, qualidade e sensibilidade (VAJTA; KUWAYAMA, 2006; VAJTA; NAGY, 2006). A eficiência da vitrificação tem sido conseguida através do aumento da velocidade de resfriamento e aquecimento. No nosso experimento, o aumento da velocidade de resfriamento foi conseguido com a utilização do nitrogênio líquido ultra-resfriado pela minimização da formação de vapor em torno das palhetas com a haste de ouro e das GMP como já tinham referido Arav, Zeron e Ocheretny (2000). A vitrificação de embriões com microvolume proporcionou maiores taxas de sobrevivência embrionária quando comparado com o macrovolume (Tabela 4 e 5), obtendo-se resultados similares aos relatados em outros estudos que utilizam o microvolume com diferentes envases (MARTINO; SONGSASEN; LEIBO, 1996; VAJTA *et al.*, 1998; LANE; SCHOOLCRAFT; GARDNER, 1999; HAMAWAKI; KUWAYAMA; HAMANO, 1999; VANDERZWALMEN *et al.*, 2000; KONG *et al.*, 2000; TOMINAGA; HAMADA, 2001; CHEN *et al.*, 2001; MATSUMOTO *et al.*, 2001; LIEBERMANN *et al.*, 2002; LÓPEZ-BÉJAR; LÓPEZ-GATIUS, 2002; ISACHENKO *et al.*, 2003a; CREMADES *et al.*, 2004; HREDZAK *et al.*, 2005; KUWAYAMA *et al.*, 2005).

Vajta *et al.* (1998) demonstraram que o método de vitrificação dos embriões envasados em OPS apresentou velocidades de resfriamento e aquecimento de mais de 20.000°C/min, proporcionando melhores resultados de sobrevivência, provavelmente diminuindo a possibilidade da ocorrência de lesões celulares durante o processo de criopreservação. Em nosso estudo, velocidades mais rápidas de resfriamento foram alcançadas com as GMP, devido ao reduzido volume da amostra (0,1 µL) e pela alta condutividade do calor pelo vidro. Por outro lado, o volume utilizado na vitrificação com macrovolume nas palhetas com a haste de ouro foi 100 vezes superior, o que provavelmente determinou velocidades inferiores de resfriamento do sistema, em torno de 2.500°C/min, como descrito por Palasz e Mapletoft (1996). O experimento também revelou que a termocondutividade da haste de ouro, provavelmente, não incrementou as velocidades de resfriamento e aquecimento, proporcionando baixas taxas de sobrevivência embrionária (Tabela 4 e 5).

As GMP como alternativa às OPS desenvolvidas por Vajta *et al.*, (1997) oferecem vantagens quando comparadas às palhetas de plástico (KONG *et al.*, 2000) pela sua maior eficiência nas trocas de temperatura, impedindo de maneira mais segura a não formação de cristais de gelo (CHO *et al.*, 2002). A redução do volume da amostra também permite a diminuição da concentração da solução crioprotetora reduzindo seu efeito tóxico. Kuwayama (2007) destaca uma vantagem das GMP, que por tratar-se de um sistema aberto, raramente ocorrem fraturas das estruturas embrionárias.

A desidratação das células é um fator importante na vitrificação. Em nosso experimento, os resultados revelaram que a exposição dos embriões à solução de desidratação por maior tempo (3 min) e a vitrificação dos embriões envasados nas GMP proporcionaram maiores taxas de eclosão. Vajta e Nagy (2006) destacaram que, para estádios avançados de desenvolvimento embrionário como o blastocisto, é necessário maior tempo de desidratação em decorrência da relação superfície/volume do embrião. Por outro lado os embriões vitrificados em macrovolume apresentaram maiores taxas de sobrevivência quando desidratados por 1 min. Esta observação pode ter como causa a diminuição das velocidades de resfriamento e aquecimento, ocasionando um lento processo de vitrificação, que pode ter levado à cristalização da solução de vitrificação (KASAI *et al.*, 1990; O'NEIL *et al.* 1997).

Outra alternativa utilizada no experimento para aumentar a eficiência da vitrificação foi a de modificar a técnica de aquecimento do sistema com o objetivo de diminuir as lesões celulares. A imersão das palhetas com a haste de ouro e das GMP

diretamente na solução de aquecimento mantida a 37°C (ISACHENKO *et al.*, 2003b), proporcionou uma rápida diluição da SV, com conseqüente redução do seu efeito tóxico por contato direto com os embriões. Observamos que os embriões, após o aquecimento, contraíam-se apresentando diminuição do citoplasma, coloração escura nos dois grupos testados, sendo maior o número de células extrusas no espaço perivitelino no grupo de embriões vitrificados com macrovolume, fato que provavelmente deve-se à formação de gelo intracelular, o que também foi observado por Kasai (2002). Este argumento pode ser uma das explicações para os baixos resultados obtidos em nosso experimento, mas, por outro lado, deve-se também levar em consideração os 56,0% de sobrevivência embrionária observados por Costa (2007), em experimento similar ao nosso, realizado sob as mesmas condições laboratoriais.

Finalmente, em nosso experimento, a utilização do sistema de microvolume com as GMP foi mais eficiente quando se realiza a comparação das taxas de recuperação dos embriões (Tabela 6). A baixa taxa de recuperação observada no grupo das palhetas com a haste de ouro, provavelmente se deve às dificuldades do embriologista em manipular os embriões no momento do envase e na retirada dos mesmos do interior da palheta após o aquecimento.

Uma desvantagem dos sistemas abertos é o potencial risco de contaminação do meio de vitrificação e dos embriões ao ter contato direto com o nitrogênio líquido (KUWAYAMA *et al.*, 2005). Estudos relataram a contaminação dos embriões bovinos após o armazenamento em nitrogênio líquido (BIELANSKI *et al.*, 2000) assim como a contaminação cruzada entre as amostras (BIELANSKI *et al.*, 2003).

Fatores como a genética (DINNYÉS; WALLACE; RALL, 1995), diversidade de envases (VAJTA; NAGY, 2006), tipo e combinações de soluções crioprotetoras utilizadas na vitrificação (ALI; SHELTON, 1993a; MUKAIDA *et al.*, 1998; KULESHOVA *et al.*, 1999; KULESHOVA; SHAW; TROUNSON, 2001), estágio de desenvolvimento dos embriões (BERTOLINI; LANGE; RODRIGUES, 2005) exercem efeito sobre o potencial de desenvolvimento dos embriões murinos após vitrificação, proporcionando variabilidade dos resultados, fato que dificulta e, na grande maioria dos casos, impede a comparação dos resultados obtidos em diferentes experimentos.

## CONCLUSÃO

As reduzidas taxas de sobrevivência obtidas após vitrificação dos embriões expostos à solução crioprotetora recomendada para microvolumes, e envasados nas palhetas com a haste de ouro, não a recomendam como técnica de criopreservação, nas condições utilizadas neste experimento.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento do projeto.

## REFERÊNCIAS

- ALI, J.; SHELTON, J.N. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 471-477, 1993a. Abstract.
- ALI, J.; SHELTON, J.N. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 459-465, 1993b. Abstract.
- ARAV, A. Vitrification of oocytes and embryos. *In*: LAURIA, A., GANDOLFI, F. (Eds.), **Embryonic Development and Manipulation in Animal Production**. Portland Press, London and Chapel Hill, 1992. cap. 22, p. 255-264.
- ARAV, A.; ZERON, Y.; OCHERETNY, A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 248, 2000.
- BERTOLINI, M.; LANGE, M.C.; RODRIGUES, J.L. *In vitro* and *in vivo* survival of mouse morulae and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n.3, p. 245-251, 2005.
- BIELANSKI, A.B. Potential for disease control or transmission by embryos produced *in vitro*: A review of current literature. **Manual of the International Embryo Transfer Society**, Chapter 3, p. 45-53, 1998.
- BIELANSKI, A.B. *et al.* Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v.40, p. 110-116, 2000.
- BIELANSKI, A.B. *et al.* Microbial contamination of embryos and semen during long-term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v.46, p. 146-152, 2003.
- CHEN, S.U. *et al.* Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS)

achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. **Human Reproduction**, v.16, n.11, p. 2350-2356. 2001.

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

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

CREMADES, N. *et al.* Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. **Human Reproduction**, v. 19, n.2, p. 300-305, 2004.

DINNYÉS, A.; WALLACE, G.A.; RALL, W.F. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods. **Molecular Reproduction and Development**, v. 40, n.4, p. 429–435, 1995. Abstract.

DINNYÉS, A.; *et al.* Cryopreservation of mammalian embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n.1, p. 171–190, 2006.

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

FAHY, G.M.; LEVY, D.I.; ALI, S.E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**, v. 24, n.3, p. 196-213, 1987. Abstract.

FAHY, G.M. *et al.* Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v. 27, n.3, p. 247-268, 1990. Abstract.

HAMAWAKI, A.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. **Theriogenology**, v. 51, p. 165, 1999.

HREDZAK, R. *et al.* Clinical experience with a modified method of human embryo vitrification. **Ceska Gynekol**, v. 70, n.2, p. 99-103, 2005. Abstract.

ISACHENKO, V. *et al.* Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 445-452, 2003a.

ISACHENKO, V. *et al.* New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. **Theriogenology**, v. 59, p. 1209-1218, 2003b.

KASAI, M. *et al.* A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **Journal of**



**Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 91 – 97, 1990. Abstract.

KASAI, M. *et al.* High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1042-1046, 1992.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 67-75, 1996.

KASAI, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 1, p. 1-9, 2002.

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

KULESHOVA, L.L. *et al.* Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 119-130, 1999.

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

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, n.5, p. 608-614, 2005.

KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. **Theriogenology**, v. 67, p. 73-80, 2007.

LANDA, V.; TEPLA, O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. **Folia Biol (Praha)**, v. 36, n.3-4, p. 153-158, 1990. Abstract.

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, n.6, p. 1073-1078, 1999.

LIEBERMANN, J. *et al.* Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 4, n.2, p. 146-150, 2002a.

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.

MATSUMOTO, H. *et al.* Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes

using nylon mesh. **Cryobiology**, v. 42, p. 139–144, 2001.

MUKAIDA, T. *et al.* Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 13, n.10, p. 2874-2879, 1998.

NIBART, M.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. General sanitary procedures associated with *in vitro* production of embryos. **Manual of the International Embryo Transfer Society**, Chapter 5, p. 67-77, 1998.

O'NEIL, L. *et al.* Vitrification of mature mouse oocytes: Improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. **Cryobiology**, v. 34, p. 295-301, 1997.

PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 14, n.2, p. 127-149, 1996.

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

SHAW, J.M. *et al.* Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll or Dextran. **Cryobiology**, v. 35, p. 219-229, 1997.

THIBIER, M. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer- Year 2006. In : **Embryo Transfer Newsletter**, vol. 25, n.4, p. 15-21, 2007.

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y. Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 47, n.5, p. 267-273, 2001.

VAJTA, G. *et al.* Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryoletters**, v. 18, p. 191-195, 1997.

VAJTA, G.; HYTTEL, P.; CALLESEN, H. Morphological changes of *in vitro*-produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, n.1, p. 9-17, 1997. Abstract.

VAJTA, G. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53–58, 1998.

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

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n.6, p.779-796, 2006.

VANDERZWALMEN, P. *et al.* “*In vitro*” survival of metaphase II oocytes (MII) and

blastocyst after vitrification in an hemi-straw (HS) system. **Fertility and Sterility**, v. 74, p. 215-216, 2000.

VIEIRA, A.D. *et al.* 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.

WRATHALL, A.E.; SUTMÖLLER, P. Potential of embryo transfer to control transmission of disease. **Manual of the International Embryo Transfer Society**, Chapter 02, p. 17-44, 1998.

ZHU, S.E. *et al.* Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 139-145, 1993. Abstract.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**

A criopreservação de material genético converteu-se em uma ferramenta apropriada para a preservação de genomas. A expectativa de melhorar as taxas de sobrevivência embrionária mediante o desenvolvimento de novas e eficientes metodologias, que consigam elaborar protocolos para vitrificação de ovócitos e embriões, deve ser o foco dos futuros experimentos.

A procura do maior sucesso nas taxas de desenvolvimento embrionário dos embriões e ovócitos nas diferentes espécies animais após vitrificação, tem sido o objetivo dos diferentes protocolos de vitrificação desenvolvidos pelos grupos de pesquisa em laboratórios ao redor do mundo.

Futuras pesquisas devem ser conduzidas para determinar as velocidades adequadas de resfriamento e aquecimento das palhetas com a haste de ouro, direcionados para a adequação da composição das soluções crioprotetoras, tempo de exposição e velocidades de refriamento, com o propósito de viabilizar o emprego destas palhetas na vitrificação de embriões mamíferos.

Por outro lado, torna-se necessário também avaliar o efeito crioprotetor de outras combinações de soluções crioprotetoras no sistema de macro e microvolume, realizando modificações tanto na concentração quanto no tipo de crioprotetores permeáveis e não permeáveis utilizadas. As modificações da solução crioprotetora terão influência sobre as taxas de sobrevivência embrionária, tanto em resposta direta ao efeito tóxico, quanto sobre as propriedades intrínsecas do procedimento de vitrificação.

O entendimento dos processos biológicos, químicos e físicos que ocorrem na criopreservação de ovócitos e embriões facilitarão a implementação de novos protocolos que visem a obtenção de maiores taxas de sobrevivência embrionária após a exposição a diferentes soluções crioprotetoras e o emprego de procedimentos alternativos de vitrificação.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, P.R.L. *et al.* Vitrificação de embriões *Mus musculus* em 9,0 M de etilenoglicol. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, n.1, p. 21-29, 1997.
- ALI, J.; SHELTON, J.N. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 471-477, 1993. Abstract.
- AMARAL, V.L.L. *et al.* Comparison of the efficiency of two vitrification solutions for mouse morulae. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 313, 2006.
- 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, n.2, p. 69-72, 1987.
- ARAV, A. Vitricification of oocytes and embryos. *In*: LAURIA, A., GANDOLFI, F. (Eds.), **Embryonic Development and Manipulation in Animal Production**. Portland Press, London and Chapel Hill, 1992. cap. 22, p. 255-264.
- ARAV, A.; ZERON, Y. Vitricification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitricification solution and by the cooling conditions. **Theriogenology**, v. 47, p. 341, 1997.
- ARAV, A.; ZERON, Y.; OCHERETNY, A. A new device and method for vitricification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 248, 2000.
- ASSAF, S.S. *et al.* Vitricificação de embriões *Mus domesticus domesticus* contidos em volumes diferentes de 9,0 M de etileno glicol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 990, 2007.
- BERTOLINI, M.; LANGE, M.C.; RODRIGUES, J.L. *In vitro* and *in vivo* survival of mouse morulae and blastocysts following vitricification in 45% glycerol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n.3, p. 245-251, 2005.
- BUNN, S. *et al.* Reduction in cryoprotectant concentrations on the vitricification of immature bovine oocytes, under a high cooling rate. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n.1, p. 309, 2006.
- CHEN, S.U. *et al.* Vitricification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. **Human Reproduction**, v.16, n.11, p. 2350-2356. 2001.
- CHO, S.K. *et al.* Improvement in post-thaw viability of *in vitro*-produced bovine blastocysts vitricified by glass micropipette (GMP). **Animal Reproduction Science**, v. 73, p. 151-158, 2002.

COCERO, M.J. *et al.* Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. **Cryobiology**, v. 33, p. 502-507, 1996.

CÔRTEZ, C.G.P.; RODRIGUES, J.L. Sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em meio contendo 9,0 M de etileno glicol na presença de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n.3, p. 461-467, 2000.

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

CREMADES, N. *et al.* Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. **Human Reproduction**, v. 19, n.2, p. 300-305, 2004.

DINNYÉS, A.; *et al.* High development rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 513–518, 2000.

DONNAY, I. *et al.* Vitrification of *in vitro* produced bovine blastocysts: Methodological studies and developmental capacity. **Animal Reproduction Science**, v. 52, p. 93-104, 1998.

DUMOULIN, J.C. *et al.* The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. **Fertility and Sterility**, v. 62, n.4, p. 793-798, 1994. Abstract.

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

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

GREGORY, R.M.; RODRIGUES, J.L. Utilização de duas concentrações de glicerol no congelamento de embriões bovinos. **Anais do VI Simpósio Nacional de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, p. 375, 1985.

HAMAWAKI, A.; KUWAYAMA, M.; HAMANO, S. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. **Theriogenology**, v. 51, p. 165, 1999.

HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M.; POWERS, R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure and developmental potencial of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 161-168, 1996.

HOTZEL, M.J.; RODRIGUES, J.L. Efeito do período de equilíbrio na solução crioprotetora intracelular a 20°C na sobrevivência *In Vivo* de blastocistos de *Mus*

*musculus* vitrificados. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 20, p. 173-187, 1992.

HREDZAK, R. *et al.* Clinical experience with a modified method of human embryo vitrification. **Ceska Gynekol**, v. 70, n.2, p. 99-103, 2005. Abstract.

ISACHENKO, V. *et al.* Double vitrification of rat embryos at different developmental stages using an identical protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 445-452, 2003.

JIANG, J.Y.; UMEZU, M.; SATO, E. Vitrification of two-cell rat embryos derived from immature hypothyroid rdw rats by *in vitro* fertilization in ethylene glycol-based solutions. **Cryobiology**, v. 38, p. 160-164, 1999.

KASAI, M. *et al.* A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 91 – 97, 1990. Abstract.

KASAI, M. *et al.* High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1042-1046, 1992.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 67-75, 1996.

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

KULESHOVA, L.L. *et al.* Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 119-130, 1999.

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

KULESHOVA, L.L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertility and Sterility**, v. 78, n.3, p. 449-454, 2002.

KUWAYAMA, M. *et al.* Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, n.5, p. 608-614, 2005.

LANDA, V.; TEPLA, O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. **Folia Biol (Praha)**, v. 36, n.3-4, p. 153-158, 1990. Abstract.

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, n.6, p. 1073-1078, 1999.

LIEBERMANN, J. *et al.* Blastocyst development after vitrification of multipronuclear

zygotes using the Flexipet denuding pipette. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 4, n.2, p. 146-150, 2002a.

LIEBERMANN, J. *et al.* Potential importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1671-1680, 2002b.

LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Vitriificação de embriões *Mus musculus*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 3., REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 1., 1988, Santa Maria – RS. **Anais...:Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões**, , n.1-2 , p. 8, 1988.

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

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

LOVELOCK, J.E.; BISHOP, M. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. **Nature**, v. 183, p. 1394–1395, 1959. Abstract.

LUYET, B.J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. **Biodynamica**, v. 1, p. 1-14, 1937. Abstract.

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

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

MAZUR, P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. **Cryobiology**, v. 2, n.4, p. 181-192, 1966. Abstract.

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

MAZUR, P.; SCHNEIDER, U. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. **Cell Biophys**, v. 8, n.4, p. 259-285, 1986. Abstract.

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

OLIVEIRA A.T.D.; RODRIGUES, J.L. NIEMANN, H. Vitrification of bovine IVMFC-derived embryos dehydrated with 3,6 M of ethylene glycol and sucrose. **Revista Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 26, n.1, p. 335, 1998.



- OLIVEIRA, A.T.D. *et al.* Vitriificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* usando etilenoglicol e sacarose. **ARS Veterinária**, v. 19, n.2, p. 191-201, 2003.
- O'NEIL, L. *et al.* Vitrification of mature mouse oocytes: Improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. **Cryobiology**, v. 34, p. 295-301, 1997.
- PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 14, n.2, p. 127-149, 1996.
- PALHA, M.D.C.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Influência do tempo de equilíbrio na vitriificação de mórulas compactas e blastocistos de *Mus musculus*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 15, n.1-2, p. 65-73, 1991.
- 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.
- RODRIGUES, J.L.; GREGORY, R.M. Alternative mechanical system to freezing embryos. In: ANNUAL CONFERENCE OF INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. 1986, Colorado. **Proceedings...** Colorado: IETS, 1986. **Theriogenology**, v. 25, n.1, p. 191, 1986.
- SHAW, J.M.; WARD, C.; TROUNSON, A.O. Fertilization and early embryology: Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. **Human Reproduction**, v. 10, n.2, p. 396-402, 1995. Abstract.
- SHAW, J.M. *et al.* Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll or Dextran. **Cryobiology**, v. 35, p. 219-229, 1997.
- SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine *in vitro* produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v. 38, p. 95-105, 1999.
- TOMINAGA, K.; HAMADA, Y. Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 47, n.5, p. 267-273, 2001.
- VAJTA, G. *et al.* Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryoletters**, v. 18, p. 191-195, 1997.
- VAJTA, G. *et al.* Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53-58, 1998.
- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**,

v. 65, p. 236–244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n.6, p.779-796, 2006.

VANDERZWALMEN, P. *et al.* “*In vitro*” survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocyst after vitrification in an hemi-straw (HS) system. **Fertility and Sterility**, v. 74, p. 215-216, 2000.

VIEIRA, A.D. *et al.* Bovine *in vitro* embryo production protocol: Does it really influence embryo cryotolerance?. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n.1, p. 57-63, 2006.

VIEIRA, A.D. *et al.* 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.

WURTH, Y.A. *et al.* Developmental potential of *in vitro* produced bovine embryos following cryopreservation and single-embryo transfer. **Theriogenology**, v. 42, n.8, p. 1275-1284, 1994. Abstract.

ZHU, S.E. *et al.* Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 139-145, 1993. Abstract.

**ANEXO A – PROTOCOLO DO TESTE DE EMBRIOTOXICIDADE DAS  
SOLUÇÕES DE DESIDRATAÇÃO E VITRIFICAÇÃO**

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

**TESTE DE TOXICIDADE: SD** \_\_\_\_\_ **SV** \_\_\_\_\_

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

**DADOS COLETA:** \_\_\_\_\_ **Hora Início** \_\_\_\_\_ **Hora término** \_\_\_\_\_

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

**EMBRIOTOXICIDADE:** \_\_\_\_\_ **Hora Início** \_\_\_\_\_ **Hora término** \_\_\_\_\_

No. FÊMEA	CONTROLE	SD			SV		
		TTO 1 1 min	TTO 2 3 min	TTO 3 10 min	TTO 4 25 seg	TTO 5 60 seg	TTO 6 180 seg
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
TOTAL							

**CULTIVO:**

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

PLACA 1				PLACA 2			
CONTROLE	SD			CONTROLE	SV		
	TTO 1	TTO 2	TTO 3		TTO 4	TTO 5	TTO 6
	1 min	3 min	10 min		25 seg	60 seg	180 seg

PLACA 3				PLACA 4			
CONTROLE	SD			CONTROLE	SV		
	TTO 1	TTO 2	TTO 3		TTO 4	TTO 5	TTO 6
	1 min	3 min	10 min		25 seg	60 seg	180 seg

**OBSERVAÇÕES:**

MEIOS	KSOM LOTE _____ pH. _____ Osm _____ Data preparação _____ Preparou _____ SD LOTE _____ SV LOTE _____ Data preparação _____ Preparou _____
BIOTERIO	
COLETA	
CULTIVO	
OUTRAS	



**ANEXO B – PROTOCOLO DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES DE  
CAMUNDONGO EM MACRO E MICROVOLUME**

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

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

**DADOS COLETA:** Hora Início \_\_\_\_\_ Hora término \_\_\_\_\_

No. FÊMEA	Degenerados	Mórulas	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	PALHETAS COM A HASTE DE OURO	GMP
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			
CONTROLE	TTO 1	TTO 2	TTO 2*	CONTROLE	TTO 1	TTO 2	TTO 2*
	Palheta	GMP	GMP		Palheta	GMP	GMP

PLACA 3				PLACA 4			
CONTROLE	TTO 1	TTO 2	TTO 2*	CONTROLE	TTO 1	TTO 2	TTO 2*
	Palheta	GMP	GMP		Palheta	GMP	GMP

PLACA 5				PLACA 6			
CONTROLE	TTO 1	TTO 2	TTO 2*	CONTROLE	TTO 1	TTO 2	TTO 2*
	Palheta	GMP	GMP		Palheta	GMP	GMP

**OBSERVAÇÕES:**

MEIOS	KSOM LOTE ____ pH. ____ Osm _____ Data preparação _____ Preparou _____ SD LOTE ____ SV LOTE ____ Data preparação _____ Preparou _____
BIOTERIO	
COLETA	
VITRIFICAÇÃO	
AQUECIMENTO	
CULTIVO	
OUTRAS	





