

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS – BOTUCATU

RENATA ELISA GREEN

PRINCÍPIOS E TÉCNICAS DA VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

Monografia apresentada à disciplina
“Seminários I” do programa de pós-
graduação em Medicina Veterinária,
nível mestrado, área de concentração
em Reprodução Animal da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootécnica
da UNESP, Campus de Botucatu.

ORIENTADOR: Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo

PROFESSORES RESPONSÁVEIS: Profa. Adj. Maria Denise Lopes
Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo

BOTUCATU – SP
Março - 2005

RESUMO

A necessidade do aprimoramento de técnicas para o transporte e comercialização de embriões tem estimulado diversas pesquisas sobre criopreservação de embriões nas espécies domésticas. A criopreservação visa manter o metabolismo celular em estado quiescente, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado. As técnicas utilizadas para o armazenamento dos embriões são a congelação tradicional e a vitrificação. O método de vitrificação de embriões tem despertado o interesse em várias espécies por requerer equipamentos de baixo custo e permitir sua execução de modo mais rápido. O princípio fundamental da vitrificação reside na necessidade de remover o máximo possível de água das células através da adição de altas concentrações de crioprotetores, promovendo a solidificação das células sem que haja a formação de cristais de gelo intra e extracelular. Esse processo é determinado pela extrema elevação da viscosidade e rápidas taxas de resfriamento e aquecimento. O objetivo desta monografia é elucidar os princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO | 1 |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | 3 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 4 |
| INTRODUÇÃO | 5 |
| REVISÃO DA LITERATURA | 6 |
| 1. PRINCÍPIOS DA VITRIFICAÇÃO | 6 |
| 2. AGENTES CRIOPROTETORES | 8 |
| 3. TÉCNICAS DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES | 10 |
| 3.1. Técnica convencional de envasamento em palhetas de 0,25mL | 11 |
| 3.2. Método OPS – Open Pulled Straw | 12 |
| 3.3. Técnica de vitrificação em grades de microscopia eletrônica de transmissão | 13 |
| 3.4. Técnica “Cryoloop” | 13 |
| 3.5. Método em micropipeta de vidro – GMP | 14 |
| 4. DESCONGELAÇÃO | 15 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 15 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 16 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1 – Soluções de vitrificação usadas para criopreservação de embriões de mamíferos (kasai, 1996) 8

FIGURA 1 – Embriões armazenados em palheta francesa de 0,25ML (Naitana et al., 1997)11

LISTA DE ABREVIATURAS

OPS = open pulled straw

GMP = micropipeta de vidro

DMSO = dimetilsulfóxido

PVP = polivinilpirrolidona

SFB = soro fetal bovino

PBS = phosphate buffered saline – solução salina tamponada

M = molar

mL = mililitro

μ L = microlitro

INTRODUÇÃO

A criopreservação de embriões é amplamente utilizada em indústrias de biotecnologia de animais domésticos permitindo o armazenamento de materiais biológicos por tempo indeterminado sem que estes percam a sua atividade funcional e sem que ocorra alteração genética (WHITTINGHAM, 1980; MAZUR, 1984). Os dois métodos de criopreservação mais amplamente utilizados são o congelamento tradicional e a vitrificação. Durante os últimos anos, a vitrificação de embriões vem sendo estudada com o objetivo de aprimorar os resultados obtidos com a utilização do congelamento tradicional (BERTHELOT *et al.*, 2003).

A vitrificação evita a formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares que são os responsáveis pela danificação das membranas e organelas celulares. Esse processo é determinado pelo uso de crioprotetores de alta concentração e rápidas taxas de resfriamento e aquecimento (PAPADOPOULOS *et al.*, 2002).

Rall *et al.* (1985) foram os primeiros a demonstrar o sucesso da vitrificação em embriões de ratos de 8 células, enquanto Massip *et al.* (1987) dois anos mais tarde, publicou o primeiro sucesso da vitrificação de embriões bovinos. Estudos mostraram que o êxito da vitrificação depende de diversos fatores, dentre eles o estágio de desenvolvimento e a fonte dos embriões (in vivo ou in vitro), além dos meios crioprotetores (LEONI *et al.*, 2002). Dessa forma, Vajta *et al.* (1996) demonstraram que a viabilidade de embriões ovinos e bovinos vitrificados no estágio de blastocisto expandido é maior que no estágio de mórula devido a sua maior tolerância ao resfriamento depois da formação do blastocele.

Diferentes crioprotetores e protocolos de vitrificação vêm sendo utilizados para criopreservação de embriões nos últimos 20 anos. Eles diferem quanto ao tipo e concentração de crioprotetores, número de passos para equilíbrio do embrião ao meio, técnica de criopreservação, tempo de exposição e número de passos para descongelação (VAJTA *et al.*, 1998). Entretanto, as altas concentrações dos crioprotetores podem causar danos às células através do estresse osmótico e devido à toxicidade química (PAPADOPOULOS *et al.*, 2002).

Rápidas taxas de resfriamento reduzem a toxicidade dos crioprotetores e diminuem o tempo de exposição da célula a temperaturas críticas (ARAV *et al.*,

1993). Para alcançar estas rápidas taxas de resfriamento, diversas técnicas utilizando pequenos volumes de solução de vitrificação foram desenvolvidas, melhorando assim a técnica convencional em palhetas de 0,25 mL (VAJTA *et al.*, 1998) como, o método OPS – open pulled straw e suas variações (VAJTA *et al.*, 1997), método em grades de microscopia eletrônica de transmissão (MARTINO *et al.*, 1996b), Cryoloops (BEGIN *et al.*, 2003) e método em micropipeta de vidro – GMP (CHO *et al.*, 2002).

Dessa forma, a vitrificação se torna mais importante e amplamente utilizada quando forem estabelecidos protocolos definidos e com sucesso comparável ou superior a congelação tradicional. Assim, se torna clara a necessidade de um número maior de pesquisas envolvendo diferentes crioprotetores e metodologias para a dominação e difusão desta técnica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. PRINCÍPIOS DA VITRIFICAÇÃO

A vitrificação tem como objetivo manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado. Na década passada diversas metodologias foram utilizadas na criopreservação de embriões ovinos (NAITANA *et al.*, 1997; MARTINEZ *et al.*, 1998) e bovinos (MAHMOUDZADEH *et al.*, 1994; VAJTA *et al.*, 1998), sendo hoje, uma alternativa em potencial para a técnica de congelamento tradicional. A vitrificação é um processo rápido, prático e menos oneroso que a congelação tradicional (BARIL *et al.*, 2001), porém, ainda são escassos os resultados com esta técnica para algumas espécies domésticas, principalmente no Brasil.

O princípio da vitrificação consiste em submeter os embriões a altas concentrações de crioprotetores com a finalidade de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares. Sendo assim, torna-se possível resfriar os embriões, passando-os do estado líquido ao estado vítrio (gel amorfo) sem a formação de cristais de gelo intra e extracelular (KASAI *et al.*, 1996).

Este fenômeno pode ser considerado como um aumento extremo de viscosidade combinado a uma rápida taxa de resfriamento, baseado na

desidratação do embrião através de sua breve exposição a soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido (VAJTA, 2000).

As altas concentrações de crioprotetores podem causar danos às células devido a sua toxicidade química. Porém, os efeitos da toxicidade podem ser minimizados através da exposição breve aos crioprotetores ou através de rápidas taxas de resfriamento (VAJTA *et al.*, 1998). As rápidas taxas de resfriamento podem diminuir as injúrias celulares através da passagem direta pela zona perigosa de resfriamento entre +15°C e -5°C (MARTINO *et al.*, 1996a).

Diferentes estratégias estão sendo utilizadas para minimizar os danos osmóticos e tóxicos, através da aplicação de crioprotetores menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três crioprotetores. Desde a primeira publicação realizada por Rall & Fahy (1985) utilizando soluções com 6,5M de DMSO e propilenoglicol, inúmeras soluções de vitrificação vêm sendo estudadas utilizando várias combinações de crioprotetores (Tabela 1) (KASAI *et al.*, 1996; PALASZ & MAPLETOFT, 1996; VAJTA, 2000).

A maioria das soluções de vitrificação contém um crioprotetor, diversos sais e uma ou mais macromoléculas. As macromoléculas possuem ação estabilizadora e reparadora de membrana, protegendo as membranas celulares durante o processo de criopreservação (SHAW *et al.*, 1997).

Apesar da variedade de resultados, a vitrificação é uma técnica de criopreservação promissora na reprodução assistida, sendo um procedimento simples, menos oneroso e que requer um menor tempo despendido (DOBRINSKY, 2002).

TABELA 1 - Soluções de vitrificação usadas para criopreservação de embriões de mamíferos (KASAI, 1996).

| Referência | Agentes intracelulares (%) | Macromoléculas ^a (%) | Açúcares (M) |
|------------------------|----------------------------|---------------------------------|------------------|
| Rall & Fahy, 1985 | 18,6D + 13,4A + 9,6P | 6 PEG | - |
| Rall & Fahy, 1985 | 16,7D + 12A + 8,7P | 5,4 PEG | - |
| Scheffen et al., 1986 | 25G + 25P | - | - |
| Rall, 1987 | 40,3P | 6 PEG | - |
| Rall, 1987 | 47,4G | 6 PEG | - |
| Nakagata, 1989 | 14,2D + 5,1A + 22P | - | - |
| Smorag et al., 1989 | 35G + 35P | - | - |
| Liehman et al., 1990 | 50G | - | - |
| Labda & Tepla, 1990 | 30G | - | 1,0 Sac |
| Kasai et al., 1990 | 40E | 18 Ficoll | 0,3 Sac |
| Schiewe et al., 1991 | 47,4G | 6BSA | - |
| Ishimori et al., 1992 | 25E + 25D | - | - |
| Leibo & Oda, 1993 | 44E | 7,5PVP | - |
| Tachikawa et al., 1993 | 40G | 18 Ficoll | 0,3 Sac |
| Yoshino et al., 1993 | 40E | 18 Ficoll | 0,3 Trea |
| Zhu et al., 1993 | 30E | 21 Ficoll | 0,35 Sac |
| Tada et al., 1993 | 19,5D + 20,2 P | - | 1,0 Sac |
| Ali & Shelton, 1993 | 31E | - | 1,0 Sac |
| Saito et al., 1994 | 20E + 20G | - | 0,75 (Sac + Gli) |

^a Soro e 0,1 – 0,3% BSA não estão mostrados.

D-dimetilsulfóxido, A-acetamida, P-propilenoglicol, G-glicerol, E-etilenoglicol, PEG polietilenoglicol, BSA-albumina sérica bovina, Sac-sacarose, Trea-trealose, Gli-glicose.

2. AGENTES CRIOPROTETORES

Os crioprotetores tem como função proteger as células e tecidos durante a criopreservação e descongelação. Os crioprotetores são divididos em duas categorias: (1) intracelulares, que são solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento e o aquecimento. Os mais comumente utilizados são o etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol, etanol, etc. (2) extracelulares, que são as macromoléculas e açúcares

cuja função é reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular. Os mais utilizados são a lactose, glicose, sacarose, polivinilpirrolidona (PVP), manitol, trealose, etc (NIEMANN, 1991).

Segundo Schneider & Mazur (1984), o embrião quando exposto a um crioprotetor intracelular, retrai devido à perda de água causada pela hiperosmolaridade inicial do meio extracelular, e também porque o embrião é mais permeável à saída de água do que à entrada do crioprotetor. O índice de entrada do crioprotetor depende do coeficiente de permeabilidade deste e da temperatura da solução. O equilíbrio é atingido quando o embrião retorna ao seu volume anterior em meio isotônico.

As características fundamentais para um eficiente agente crioprotetor é o baixo peso molecular, a sua alta capacidade de atravessar a membrana celular e uma baixa toxicidade (KASAI *et al.*, 1996). Em geral, agentes com rápida capacidade de penetração são mais favoráveis, porque o tempo de exposição ao crioprotetor antes do rápido resfriamento é curto, prevenindo assim, as injúrias osmóticas (KASAI *et al.*, 1996).

Os crioprotetores extracelulares permitem a redução da concentração dos crioprotetores intracelulares, diminuindo a toxicidade celular. Segundo Rall (1987) a sacarose tem o efeito adicional de proteção celular, pois este crioprotetor extracelular causa desidratação nos embriões, reduzindo a quantidade de água no citoplasma da célula, desta forma evitando a formação de gelos intracelulares. Entretanto, Martinez *et al.* (2002) demonstraram que altas concentrações de sacarose (0.5M) resultaram em baixas taxas de eclosão do embrião.

Atualmente, a maioria das soluções de vitrificação apresenta crioprotetores diluídos em solução salina tamponada (Phosphate Buffered Saline – PBS) acrescida de 0,5mM de piruvato de sódio, 3,3mM de glicose e 20% de soro fetal bovino (SFB). No entanto, Donnay *et al.* (1998) relataram o uso de HEPES acrescido de 20% de SFB para diluição de diferentes crioprotetores e Isachenko *et al.* (2003) utilizaram a diluição em meio TCM-199 acrescido de 15% de SFB.

O etilenoglicol é o crioprotetor mais utilizado em protocolos de criopreservação nas espécies domésticas, devido ao seu baixo peso moléculas e baixa toxicidade (ALI & SHELTON, 1993, MARTINEZ & MATKOVIC, 1998). Porém, para que o etilenoglicol vitrifique, é necessária uma alta concentração

(8,0M), sendo tóxico para o embrião. Dessa forma, a estratégia para o sucesso da vitrificação está na associação de crioprotetores intracelulares e extracelulares (ALI & SHELTON, 1993). Na prática, existem diversas misturas de crioprotetores intracelulares e extracelulares que vem sendo usados e aprimorados para um melhor resultado (DOBRINSKY, 2002).

3. TÉCNICAS DE VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES

Durante os últimos anos diversas técnicas de vitrificação vem sendo desenvolvidas com o objetivo de evitar as crioinjúrias, aumentando as taxas de resfriamento e aquecimento. Concomitante a isto, inúmeros agentes crioprotetores vêm sendo utilizados em diferentes concentrações e combinações, sendo estes adicionados a soluções em um único passo ou paulatinamente e mergulhados diretamente em nitrogênio líquido a partir da temperatura ambiente (DATTENA *et al.*, 2004).

As novas técnicas de vitrificação utilizando rápidas velocidades de resfriamento reduzem drasticamente as crioinjúrias, permitindo o uso de uma menor concentração de crioprotetores e diminuindo o tempo de exposição da célula ao crioprotetor (RALL, 1987). A utilização de pequenos volumes de solução de vitrificação permite um resfriamento mais rápido e a redução de fraturas celulares (ARAV *et al.*, 2002).

Entretanto, quase todas as técnicas são baseadas no contato direto das células em meio crioprotetor com o nitrogênio líquido, o qual pode ter risco de contaminação por agentes bacterianos e virais (FOUNTAIN *et al.*, 1997). Estes perigos podem ser eliminados utilizando nitrogênio líquido esterilizado, além do armazenamento em containeres hermeticamente fechados (VAJTA *et al.*, 1998). Segundo Dattena *et al.* (2004) não foi observado nenhum problema de contaminação de embriões vitrificados através da técnica de OPS em nitrogênio líquido não esterilizado.

3.1. Técnica convencional de envasamento em palhetas de 0,25 mL

Essa técnica de vitrificação baseia-se na utilização de palhetas francesas de 0,25 mL, sendo preenchidas com duas colunas de 160 μ L solução de sacarose, seguidas de 20 μ L solução de vitrificação e 20 μ L meio contendo embriões. Todas as colunas são separadas por 60 μ L ar (Fig. 1). Após serem seladas, as palhetas são imersas em nitrogênio líquido (NAITANA *et al.*, 1997).

A taxa de resfriamento para este processo de vitrificação é de aproximadamente 2500°C/min (PALASZ & MAPLETOFT, 1996). Por outro lado, para evitar fraturas de embriões e de zona pelúcida nestas taxas de resfriamento, requer-se o uso de altíssimas concentrações de crioprotetores, muito maiores do que as requeridas para o congelamento tradicional, sendo considerada de alta toxicidade aos embriões (KASAI, 1997).

Resultados animadores na vitrificação de embriões com a utilização desta técnica têm sido relatados por alguns autores. DATTENA *et al.* (2000) obtiveram de 62 embriões colhidos e vitrificados, 52 (83,8%) com re-expansão da blastocela após cultivo por 24 horas e 39 cordeiros nascidos (62,9%). BARIL *et al.* (2001), relataram taxa de prenhez e de sobrevivência embrionária depois da inovulação de embriões vitrificados de 72 e 50%, respectivamente.

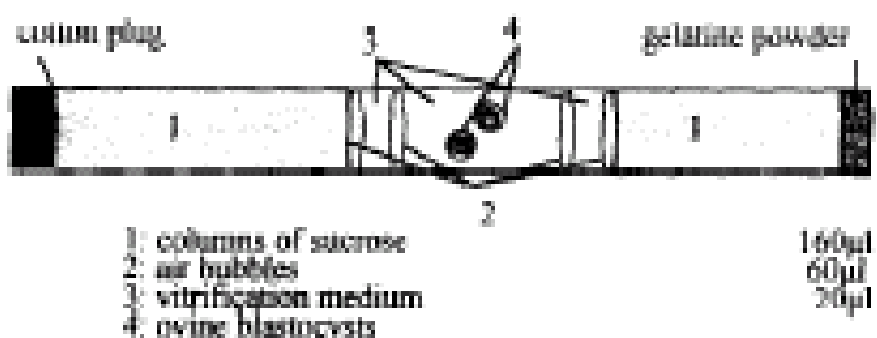


Figura 1 - Embriões armazenados em palheta francesa de 0,25ML (Naitana *et al.*, 1997).

3.2. Método OPS – Open Pulled Straw

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

As palhetas de OPS foram desenvolvidas através das palhetas francesas de 0,25mL, sendo os tampões de algodão removidos e estas amolecidas por aquecimento em sua região central. Manualmente, as palhetas foram esticadas até que o diâmetro interno e a espessura da parede diminuíssem para aproximadamente metade do tamanho original. Posteriormente foram resfriadas ao ar e cortadas na extremidade estreita. Aproximadamente 1 a 2µL do meio de vitrificação contendo o embrião é introduzido na extremidade estreita da palheta através do efeito capilar simples. A extremidade contendo o embrião é imediatamente imersa no nitrogênio líquido, solidificando a coluna líquida sem que haja dispersão da solução (VAJTA *et al.*, 1998).

A taxa de resfriamento é aumentada em oito vezes quando comparada as palhetas francesas de 0,25mL, sendo acima de 20000°C/min (VAJTA *et al.*, 1998). Estas taxas de resfriamento são alcançadas devido à redução do volume das soluções e a diminuição da espessura da parede da palheta (0,07mm). Dessa forma, os altos padrões de resfriamento e aquecimento resultam em diminuição das crioinjúrias, como fraturas da zona pelúcida e do embrião. Adicionalmente, com o uso das palhetas de OPS é possível alcançar a vitrificação da solução utilizando uma menor concentração de crioprotetor, juntamente com o rápido resfriamento, minimizando as injúrias tóxicas e osmóticas (VAJTA *et al.*, 1998).

Segundo López-Béjar & López-Gatius (2002), as taxas de sobrevivência embrionária, imediatamente após o descongelamento dos embriões são melhores com a utilização de OPS comparada às palhetas convencionais. Entretanto, o método OPS possui uma desvantagem, pois o meio contendo embriões fica em contato direto com o nitrogênio líquido, aumentando o risco de contaminação. Este risco pode ser diminuído filtrando-se o nitrogênio líquido através de um filtro de 0,2µL ou através de esterilização (VAJTA *et al.*, 1998). Além disso, alguns autores desenvolveram técnicas para selar as palhetas de OPS, com algodão e álcool polivinílico (LÓPEZ-BÉJAR & LÓPEZ-GATIUS, 2002).

Na tentativa de aprimorar esta técnica foi desenvolvido um novo equipamento, o qual reduz a temperatura do nitrogênio líquido para -210°C através da utilização de pressão negativa (Vit-Master®; Minitüb, Tiefenbach, Germany). Este procedimento aumenta em até quatro vezes as taxas de resfriamento (24000 – 130000°C/min) obtidas pelo método OPS (ARAV *et al.*, 2002).

3.3. Técnica de vitrificação em grades de microscopia eletrônica de transmissão

Esta técnica consiste em manter os embriões em pequeno volume de crioprotetor, criopreservando-os em grades de microscopia eletrônica, sendo mergulhados diretamente em nitrogênio líquido. Este modelo de vitrificação foi desenvolvido por Martino *et al.* (1996b), onde se utilizam grades de microscopia eletrônica de transmissão como suporte físico para os embriões, as quais são submersas em nitrogênio líquido, atingindo taxas de resfriamento superiores a 20000°C/min.

Os embriões são expostos à solução crioprotetora e com auxílio de uma delicada pipeta são transferidos sobre o topo da grade em um volume pequeno (1µL). Para diminuir o volume de meio de vitrificação, o lado inferior da grade é colocado sobre um papel filtro para a retirada do excesso, restando apenas os embriões na parte superior da grade. Desta forma, a grade é imediatamente imersa no nitrogênio líquido, sendo o tempo transcorrido da exposição dos embriões aos crioprotetores até a imersão em nitrogênio líquido não superior a 30 segundos (MARTINO *et al.*, 1996b).

3.4. Técnica “Cryoloop”

Esta técnica foi desenvolvida por Lane *et al.* (1999) utilizando um laço de nylon (0,5 a 0,7mm de diâmetro e 20µm de largura) sobreposto em um cilindro de aço inoxidável inserido sobre o topo de uma via de acesso ao nitrogênio líquido. Enquanto os embriões estão passando pela primeira solução de vitrificação, o cryoloop é mergulhado na segunda solução crioprotetora para formar uma fina

película de meio sobre o laço de nylon. Posteriormente o meio de vitrificação contendo o embrião (1-2 μ L) é colocado sobre a película utilizando uma pequena pipeta de vidro. Imediatamente, o cryoloop é imerso no nitrogênio líquido, sendo o intervalo entre o contato do embrião com o crioprotetor e a imersão menor que 45 segundos (BEGIN *et al.*, 2003; OBERSTEIN *et al.*, 2001).

Esta técnica consiste no mesmo princípio da técnica de vitrificação em grades de microscopia eletrônica de transmissão. Entretanto o cryoloop utiliza um sistema com recipiente pequeno, favorecendo a rápida troca de calor durante o resfriamento, reduzindo as crioinjúrias. Begin *et al.* (2003) demonstraram bons resultados de sobrevivência embrionária com a utilização desta técnica.

3.5. Método em micropipeta de vidro – GMP

Esta técnica foi desenvolvida com o objetivo de substituir a palheta de OPS por uma palheta que não flutue em nitrogênio líquido e que tenha o diâmetro interno e externo menor, melhorando as taxas de condutividade de calor durante o resfriamento. Adicionalmente, utiliza menores volumes de soluções de vitrificação, buscando um menor dano ao embrião (CHO *et al.*, 2002).

A micropipeta de vidro é produzida através do estiramento de capilares de vidro, utilizando a mesma técnica descrita para produção da palheta de OPS. Realizando a comparação entre a palheta de OPS e o GMP, Cho *et al.* (2002) constataram que o diâmetro externo e interno da OPS é de 1,7mm e 0,8mm, respectivamente, podendo armazenar um volume de 2,68mm³ de solução de vitrificação. Em contrapartida, a micropipeta de vidro possui 1,0mm de diâmetro externo e 0,3mm de diâmetro interno, sendo possível armazenar um volume de apenas 0,14mm³

Entretanto, não foi observada diferença nos resultados obtidos de embriões vitrificados pelo método de OPS e GMP (CHO *et al.*, 2002). Esta técnica ainda possui uma limitação devido a fragilidade da micropipeta, sendo freqüentemente quebrada ou rachada próximo a extremidade mais fina.

4. DESCONGELAÇÃO

O procedimento de retirada do crioprotetor é necessário para que ocorra a rehidratação dos embriões e diminua danos causados pela sua toxicidade. De acordo com Schneider & Mazur (1984), a diluição do crioprotetor tem como função evitar a entrada muito rápida de água na célula, pois uma redução drástica na osmolaridade levaria a lise celular. Este fenômeno pode ser assegurado pela adição de altas concentrações de compostos extracelulares, como a sacarose e trealose ao meio de diluição.

A sacarose atua como um tampão osmótico, mantendo constante a concentração do meio extracelular, regulando a velocidade de entrada e saída do crioprotetor no embrião, evitando o choque osmótico (LEIBO, 1984).

As palhetas francesas de 0,25mL são descongeladas através da imersão em banho Maria a 37°C por 15 segundos. O conteúdo da palheta é depositado em soluções de descongelamento em um, dois ou três passos, com diferentes concentrações de sacarose. Somente com o emprego da sacarose no preparo das palhetas foi possível a transferência direta dos embriões para as receptoras na mesma palheta no qual foi vitrificado. Esta técnica reduziu o tempo requerido para preparar os embriões a serem transferidos e eliminou a necessidade de equipamentos (BARIL *et al.*, 2001; DATENNA *et al.*, 2004).

O aquecimento das palhetas de OPS é realizado pela colocação da ponta mais fina diretamente na placa contendo meio a 37°C. O meio vitrificado volta ao estado líquido dentro de 1 a 2 segundos, sendo que imediatamente após, o embrião flutua no meio de diluição (VAJTA *et al.*, 1998). Os meios de aquecimento contém sacarose em diferentes concentrações, sendo a diluição realizada em um, dois ou três passos. No entanto pesquisadores como Datenna *et al.* (2004) testaram diluições sem sacarose e obtiveram os mesmos resultados obtidos com a diluição em meio com sacarose.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A possibilidade de utilizar um protocolo de criopreservação prático, rápido e eficaz, como a vitrificação, estimularia a aplicação da técnica associada à

transferência de embriões por um maior número de equipes em nível de campo. Porém, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos específicos que resultem na maximização da viabilidade embrionária pós-aquecimento.

Nos tempos atuais, a técnica tradicional de congelamento continua sendo a mais largamente utilizada para criopreservação de embriões *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, na última década a técnica de vitrificação vem sendo testada e aprimorada em diferentes espécies, buscando um elevado grau de aproveitamento dos embriões criopreservados e aquecidos.

A vitrificação não é amplamente utilizada e aceita por profissionais em transferência de embriões devido a alguns fatores, como: (1) o congelamento tradicional tem resultados aceitáveis nos animais domésticos; (2) existe uma extrema diversidade de métodos e protocolos de vitrificação, não sendo estabelecido um com melhores resultados; (3) a vantagem prática da vitrificação é relativa, sendo que o tempo requerido para a vitrificação é menor que 3 minutos, porém cada palheta deve ser vitrificada individualmente; (4) poucas empresas que fabricam equipamentos estão interessadas em divulgar esta técnica, pois não requer equipamentos sofisticados.

Em contrapartida, os efeitos benéficos da vitrificação são amplamente conhecidos, como a redução das crioinjúrias causadas pela não formação de cristais intra e intracelulares.

Recentemente, a vitrificação vem sendo estudada e utilizada na criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, procurando a obtenção de melhores resultados. Além disso, está sendo aplicada com suma importância em novas tecnologias como clonagem e micromanipulação, na tentativa de se obter uma melhor taxa de sobrevivência embrionária à criopreservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, J., SHELTON, J.N. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p. 471-477, 1993.
- ARAV, A., SHEHU, D., MATTIOLI, M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v. 99, p. 353-358, 1993.
- ARAV, A., YAVIN, S., ZERON, Y., NATAN, D., et al. New trends in gamete's cryopreservation. **Mol. Cell. Endocrin.**, v. 187, p. 77-81, 2002.
- BARIL, G., TRALDI, A-L., COGNIÉ, Y., LEBOEUF, B., et al. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**, v.56, p.299-305, 2001.
- BEGIN, I., BHATIA, B., BALDASSARRE, H, DINNYES, A., KEEFER, C.L. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology**, v.59, p. 1839-1850, 2003.
- BERTHELOT, F., MARTINAT-BOTTE, F., VAJTA, G., TERQUIT, M. Cryopreservation of porcine embryos: state of the art. **Livestock Prod. Sci.**, v. 83, p. 73-83, 2003.
- CHO, S.-K., CHO, S.-G., BAE, I.-H., PARK, C.-S., KONG, I.-K. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 73, p. 151-158, 2002.
- DATTENA, M. et al. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1511-1519, 2000.
- DATTENA, M., ACCARDO, C., PILICHI, S., ISACHENKO, V., et al. Comparasion of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. **Theriogenology**, v. 62, p. 481-493, 2004.
- DOBRINSKY, J.R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57,p. 285-302, 2002.
- DONNAY, I., AUQUIER, Ph., KAIDI, S., CAROLAN, C., et al. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 52, p. 93-104, 1998.
- FOUNTAIN, D.M., RALSTON, M., HIGGINS, N., GORLIN, J.B., et al. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. **Transfusion**, v. 37, p. 585-591, 1997.

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

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 67-75, 1996.

KASAI, M. Cryopreservation of mammalian embryos. **Mol. Biotechnol.**, v. 7, p. 173-179, 1997.

LANE, M., BAVISTER, B.D., LYONS, E.A., FOREST, K.T. Containersless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nat. Biotechnol.**, v.17, p. 1234-1236, 1999.

LEIBO, SP. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 21, p. 767-790, 1984.

LEONI, G., BOGLIOLO, L., BERLINGUER, F., ROSATI, I., et al. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. **Cryobiology**, v. 45, p. 204-212, 2002.

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

MAHMOUDZADEH, A.R., VAN SOOM, A., YSEBAERT, M.T., de KRUIF, A. Comparison of two step vitrification versus controlled freezing on survival of in vitro produced cattle embryos. **Theriogenology**, v. 42, p. 1389-1397, 1994.

MARTINEZ, A.G., MATKOVIC, M. Cryopreservation of ovine embryos: Flow freezing and vitrification. **Theriogenology**, v. 49, p. 1039-1049, 1998.

MARTINEZ, A.G., VALCÁRCEL, A., de las HERAS, M.A., de MATOS, D.G., et al. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 73, p. 11-21, 2002.

MARTINO, A., POLLARD, J.A., LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 45, p. 503-512, 1996a.

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

MASSIP, A., VAN DER ZWALMEN, P., ECTORS, F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology**, v.27, p. 69-79, 1987.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J. Physiol.**, v.247, p. 125-142, 1984.

NAITANA, S., LEDDA, S., LOI, P., LEONI, G. et al. Polyvinyl alcohol as a defined for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 48, p. 247-256, 1997.

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

OBERSTEIN, N., O'DONOVAN, M.K., BRUEMMER, J.E., SEIDEL, G.E., et al. Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. **Theriogenology**, v. 55, p. 607-613, 2001.

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

PAPADOPOULOS, S., RIZOS, D., DUFFY, P., WADE, M. et al. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. **Anim. Reprod. Sci.**, v.74, p. 35-44, 2002.

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

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

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

SHAW, J.M., KULESHOVA, L.L., MACFARLANE, D.R., TROUNSON, A.O. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll or dextran. **Cryobiology**, v. 35, p. 219-229, 1997.

VAJTA, G., HOLM, P., GREVE, T., CALLESEN, H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in straw rehydration. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 45, p. 191-200, 1996.

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

VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.

Mol. Reprod. Dev., v.51, p. 53-58, 1998.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Anim.**

Reprod. Sci., v.60-61, p.357-364, 2000.

WHITTINGHAM, D.G. Principles of embryo preservation. In: Ashwood-Smith MJ, Farrant J (eds), Low Temperature Preservation In Medicine and Biology. Uk; Pitman Medical Ltda., 1980, 65-83p.