

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES – METODOLOGIAS DE VITRIFICAÇÃO

Tiago Rollemberg Santin¹
Hélio Blume²
Rafael Gianella Mondadori³

RESUMO

A criopreservação de embriões é uma técnica que permite a melhor utilização dos embriões excedentes da transferência de embriões (TE) e da produção *in vitro* de embriões (PIV). Para melhorar os índices de sobrevivência embrionária ao processo de congelação é necessária a utilização de substâncias denominadas crioprotetores. Estes agem principalmente nas membranas biológicas (plasmática e das organelas) dos blastômeros atuando no equilíbrio osmótico e evitando a formação de cristais de gelo durante o processo de congelação, que são deletérios ao embrião. Além dos crioprotetores os métodos de congelação (suporte físico para o embrião, velocidade da curva) e as características embrionárias também afetam de forma significativa a sobrevivência dos embriões à congelação. Para embriões produzidos *in vivo* já existem protocolos bem definidos e com bons níveis de sobrevivência embrionária, como os métodos de congelação rápido. Porém quando são avaliados os índices de sobrevivência de embriões produzidos *in vitro*, estes protocolos não apresentam resultados satisfatórios. Pesquisas mais recentes têm demonstrado que a vitrificação, método de congelação ultra-rápido, pode ser uma alternativa para criopreservar estas estruturas. Trabalhos demonstraram uma grande variação entre os protocolos de vitrificação, sendo que a diferença mais significativa está no tipo de suporte físico utilizado no processo. Aparentemente, os melhores resultados foram conseguidos com os suportes físicos que permitem utilizar o mínimo possível de meio com crioprotetor, fazendo com que a queda de temperatura na solução de congelação e no embrião atinja velocidades bastante elevadas.

Palavras-chave: crioprotetores, métodos de congelação, congelação ultra-rápida

EMBRYO CRYOPRESERVATION – VITRIFICATION METHODS

ABSTRACT

The embryo cryopreservation techniques allow a more rational use the exciding embryos generated by embryo transfer (ET) or *in vitro* embryo production (IVEP). In order to increase the embryo survival rates the use of cryoprotectants is necessary. These agents act mainly in blastomeres biological membranes (plasmatic and organelles membranes), allowing osmotic equilibrium and ice crystal formation during freezing processes, which are deleterious to the embryo. As well as cryoprotectants, the freezing methodology (physical support for the embryo, curve velocity) and embryo characteristics also affect the embryo survival rates. The existing embryo freezing methodologies, as the fast freezing method, are suitable to use with *in vivo* produced embryos. On the contrary, when the same method is used for *in vitro* derived embryos, the results are very unsatisfactory. The most recent results have shown that

¹ Médico Veterinário Autônomo, tiagosantin@yahoo.com.br.

² Professor, Laboratório de Reprodução Animal – UPIS – Faculdades Integradas, helio01682@upis.br.

³ Professor Adjunto, UFPel – Departamento de Morfologia – Instituto de Biologia – Pelotas-RS, rmondadori@hotmail.com. Correspondência: Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori, Rua Dr. Nunes Vieira, 403 – Três Vendas, 96055-560, Pelotas – RS, Tel.: (53)3281-1326/(53)8111-0101, rmondadori@hotmail.com

vitrification, an ultra rapid freezing methodology, can be a good alternative to cryoprotect the *in vitro* produced embryos. Revised papers showed an enormous variation on vitrification protocols, mainly on the physical support used for embryo vitrification. Apparently, the best results are obtained with physical supports that allow the use of lesser cryoprotectants medium, which permit a very rapid temperature drop in media and embryo.

Key words: cryoprotectants, freezing methodology, ultra-rapid freezing

CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES –METODOLOGIAS DE VITRIFICAÇÃO

RESUMEN

La criopreservación de embriones es una técnica que permite una mejor utilización de las estructuras excedentes de la transferencia de embriones (TE) y de la producción *in vitro* de embriones (PIV). Para mejorar los resultados de supervivencia embrionaria al proceso de congelación se hace necesario el uso de sustancias que se denominan crioprotectores que actúan directamente en las membranas biológicas (plasmática y de las organelas) del blastómero interviniendo en el equilibrio osmótico y evitando la formación de cristales de hielos que son dañinos para el embrión. Además de los crioprotectores, los métodos de congelación (soporte físico, velocidad de la curva) y las características embrionarias también afectan de forma significativa la supervivencia de los embriones al proceso de congelación. Para embriones producidos *in vivo* los protocolos de congelación ya están bien definidos y demuestran buenos niveles de supervivencia, como por ejemplo los métodos de congelación rápida. Todavía cuando son evaluados los índices de supervivencia de embriones producido *in vitro*, estos protocolos no presentan resultados satisfactorios. Investigaciones más modernas demuestran que la vitrificación, método de congelación ultra rápido, puede ser una buena alternativa para criopreservar estas estructuras. Trabajos analizados muestran una gran variación entre los protocolos de vitrificación, siendo que la diferencia más evidente esta en el tipo de soporte físico utilizado en el proceso. Aparentemente, los mejores resultados han sido obtenidos con el uso de soportes físicos que permiten utilizar el mínimo posible de medio con crioprotector, permitiendo que la caída de temperatura en la solución de congelación y en el embrión sea el más rápido posible.

Palabras-clave: crioprotectores, métodos de congelación, congelación ultra-rápida

INTRODUÇÃO

A congelação de embriões bovinos, além do significado científico, possui uma grande importância econômica e zootécnica. Com essa biotécnica é possível estocar o material genético de uma doadora para um melhor aproveitamento dos embriões excedentes da transferência de embriões (TE) e da produção *in vitro* de embriões (PIV) e, conseqüentemente, aproveitar melhor as receptoras, sendo possível estabelecer também uma sincronização da época de parição (1). Os métodos de criopreservação de embriões se desenvolveram de maneira significativa, tornando-se a principal ferramenta para a manutenção de recursos genéticos de animais domésticos e selvagens (2).

Atualmente, a congelação de embriões produzidos *in vivo* segue um protocolo que permite a obtenção de taxas de prenhez próximas àquelas obtidas com a transferência de embriões a fresco. Entretanto, o mesmo não ocorre com embriões produzidos *in vitro* e oócitos. A maior sensibilidade destas estruturas ao processo de criopreservação gerou a necessidade de métodos alternativos que permitam garantir seu máximo aproveitamento, tanto

com propósitos científicos, como comerciais ou conservacionistas (3). Embora a criopreservação possa aumentar a produção de embriões, criopreservando embriões produzidos *in vitro* e embriões micromanipulados, essa biotécnica ainda é pouco utilizada, sendo empregada com maior frequência para embriões produzidos *in vivo* (4).

Segundo Manzur (5) o efeito mais importante da criopreservação de qualquer célula ou tecido é a formação natural de cristais de gelo, a partir da água existente nos espaços intra e extracelulares. À medida que estes cristais vão se formando, eles assumem formas e tamanhos irregulares, podendo afetar as microestruturas de membranas e organelas, comprometendo, algumas vezes de forma irreversível, a função celular (6). Buscando minimizar essas lesões são utilizados crioprotetores que têm como função proteger as células e tecidos durante a criopreservação e descongelação. Essas substâncias são divididas em duas categorias: intracelulares e extracelulares. Assim sendo, as técnicas de criopreservação vêm sendo desenvolvidas com a utilização de diversas combinações de crioprotetores intracelulares e extracelulares visando aumentar a viabilidade das estruturas criopreservadas (7).

As técnicas de congelação de embriões diferem entre si por diversas variáveis, dentre elas podem ser citadas: [1] o tipo e concentração dos crioprotetores utilizados; [2] diferentes velocidades de congelação; [3] tempo de exposição da estrutura a solução crioprotetora; [4] tipo de invólucro ou suporte físico utilizado na técnica; [5] velocidade de descongelação, entre outras. Os métodos mais utilizados para criopreservação de embriões são: congelação lenta, “one-step”, transferência direta e vitrificação (8).

REVISÃO DE LITERATURA

Crioprotetores

Conforme já citado, a congelação e descongelação levam a um rearranjo das estruturas da membrana biológica dos blastômeros, o que interfere em sua funcionalidade, principalmente na permeabilidade seletiva e difusão lateral de proteínas. Com a queda constante da temperatura, a água presente na solução de congelação começa a congelar tornando o meio extracelular hipertônico. Neste momento, para se atingir um equilíbrio osmótico, ocorre um efluxo de água da célula a ser congelada. Este efeito é conhecido como efeito solução e é considerado um dos pontos críticos no processo de congelação (9). Outro efeito importante durante a congelação é a formação de cristais de gelo intra e extracelular, os quais assumem formas e tamanhos irregulares, podendo afetar a estrutura de membranas e organelas, bem como a função celular (6, 9).

Para evitar esses danos celulares, faz-se necessário a adição de substâncias conhecidas como crioprotetores ao meio de congelação. Estas substâncias são utilizadas com o intuito de proteger os embriões dos efeitos críticos do processo de congelação. Apesar do mecanismo de ação dos crioprotetores ainda não estar completamente elucidado, sabe-se que a proteção celular ocorre, pelo menos parcialmente, pois permite uma redução do ponto de solidificação das soluções durante a congelação (8).

Segundo Dobrinsky (4), crioprotetores são solutos orgânicos que ajudam a proteger as organelas intracelulares por um longo período de estocagem em nitrogênio líquido. Uma das principais funções dos crioprotetores é remover e/ou substituir a água intracelular. Estes solutos agem conforme sua capacidade de penetrar ou não nas células, o que permite uma classificação em dois grupos: crioprotetores intra ou extracelulares (8).

Holt (10) relata que etilenoglicol, dimetilsufóxido, glicerol, propanodiol, butanodiol e metanol são os crioprotetores intracelulares mais comumente utilizados. A ação protetora destas substâncias é atribuída as suas propriedades coligativas e ligantes com a água,

diminuindo o ponto crioscópico intracelular e, portanto, aumentando a quantidade de água que permanece no estado líquido sob baixas temperaturas, reduzindo a concentração intracelular de solutos e os danos causados pela solução.

O mecanismo de ação, pelo qual os vários agentes permeabilizantes protegem as estruturas celulares, é considerado semelhante, entretanto, a toxicidade geralmente é diferente. Para a congelação, a concentração de um crioprotetor intracelular é limitada entre 1 e 2 M. Nesta concentração a toxicidade é relativamente baixa e os embriões podem ser equilibrados na solução por 10 a 20 minutos à temperatura ambiente. Dentre os crioprotetores intracelulares, o etilenoglicol é o menos tóxico, seguido pelo glicerol e propilenoglicol (1). Todavia, a toxicidade relativa de um crioprotetor pode ser diferente, de acordo com o estágio de desenvolvimento embrionário (11).

Segundo Green (12), o embrião retrai quando exposto a um crioprotetor intracelular, devido à perda de água causada pela hiperosmolaridade inicial do meio extracelular e, ainda, porque a membrana plasmática dos blastômeros é mais permeável à saída de água do que à entrada do crioprotetor. A velocidade de entrada do crioprotetor no embrião depende do coeficiente de permeabilidade deste e da temperatura da solução. O equilíbrio é atingido quando o embrião retorna ao volume original que possuía em meio isotônico.

Diferente dos anteriores, os crioprotetores extracelulares atuam por meio de mecanismo osmótico, promovendo a desidratação celular controlada durante a congelação e impedindo a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula (9). Este grupo é composto por macromoléculas e açúcares. Os mais utilizados são a lactose, glicose, sacarose, polivinilpirrolidona (PVP), manitol, trealose, entre outros (13).

Oliveira (14) relata que, tanto os crioprotetores permeáveis como os não permeáveis reagem com os fosfolípidos presentes na membrana celular e permanecem associados a estes durante todo o processo de congelação, conferindo estabilidade à membrana.

Considerando as variáveis, diversas estratégias têm sido utilizadas para minimizar os danos tóxicos e osmóticos ocorridos durante o processo de congelação e descongelação, como a utilização de crioprotetores menos tóxicos, combinações entre crioprotetores e a utilização de diferentes soluções de descongelação (12). Após a descongelação, a concentração de crioprotetor dentro do embrião é muito alta, fazendo-se necessária a utilização de uma solução que atue como um tampão osmótico, a fim de evitar a entrada rápida de água na célula, levando a um aumento exagerado do volume celular e danos ao embrião (11, 12). Diante disso, a sacarose é o crioprotetor de baixo peso molecular, não penetrante, mais utilizado nas soluções de descongelação. Esse açúcar atua mantendo constante a concentração do meio extracelular, regulando a entrada de água e saída de crioprotetor do embrião (1, 15). Outra possibilidade para a reidratação do embrião, minimizando os danos osmóticos, é a sua passagem por soluções com diferentes concentrações de crioprotetores. Para que a entrada de água na célula ocorra lentamente, o embrião é submetido a uma solução contendo sacarose e/ou crioprotetor em menor concentração e finalmente somente a sacarose (11).

Métodos de Congelação

Os embriões produzidos *in vivo*, destinados a congelação, são colhidos usualmente entre os dias 6 e 8 do ciclo estral, enquanto que os produzidos *in vitro* são criopreservados entre o dia 6 e 8 após a fecundação (dia 0). Assim, ambos encontram-se entre o estágio de mórula a blastocisto (16).

Segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (16), a classificação baseada na integridade morfológica dos embriões varia de 1 a 4, podendo ser congelados somente aqueles de grau 1 (excelentes ou bons), os quais possuem massa embrionária simétrica e esférica, com blastômeros individuais, uniformes em tamanho, cor e densidade. As

características que sabidamente denotam baixa qualidade embrionária devem ser relativamente poucas e, pelo menos, 85% do material celular deve se apresentar como uma massa embrionária viável, intacta. Este julgamento deve ser baseado na porcentagem de células extravasadas no espaço perivitelínico. A zona pelúcida deve estar íntegra, lisa e sem superfícies côncavas ou planas, evitando aderência do embrião à placa de petri ou palheta.

Tradicionalmente, os embriões podem ser submetidos a diferentes métodos de criopreservação, tais como: [1] criopreservação pelo método convencional; [2] criopreservação pelo método “One-Step” e; [3] criopreservação para a transferência direta (DT), sendo que, em todos, a curva ideal de congelação é obtida por meio de congeladores biológicos programáveis. Apesar do fácil manuseio e da eficiência que esses equipamentos computadorizados oferecem, necessitam de um ambiente climatizado e de uma corrente elétrica estável para funcionar em condições mínimas de segurança (17).

Utilizando o método convencional, citado por Reichenbach et al. (8) para criopreservar blastocistos bovinos produzidos *in vitro*, Kaidi et al. (18) obtiveram 24% de taxa de re-expansão das estruturas após descongelação e cultivo por 72 horas.

Leibo (15) desenvolvendo o método “One-step” obteve 327 prenhez de um total de 1259 embriões bovinos inovulados. Nedambale et al. (19), utilizando a mesma metodologia, congelaram 297 embriões bovinos produzidos *in vitro* e obtiveram 143 (48%) embriões re-expandidos após 6 horas da descongelação, 118 (40%) após 24 horas e 91 (31%) após 48 horas. A taxa de eclosão foi de 22%.

O método para a transferência direta (DT) foi utilizado por Dochi et al. (20), para criopreservar mórulas e blastocistos bovinos em soluções contendo 1,8 M de etilenoglicol (EG) ou 1,8 M EG com 0,25 M de sacarose. Após a descongelação e inovulação, o índice de gestação obtido foi de 69% (20/29) para o grupo congelado com EG e 52% (13/25) para o grupo EG + sacarose. Visando avaliar tal metodologia, Mucci et al. (21) utilizaram solução composta de 1,5 M de EG e 5 mg/mL de soro fetal bovino diluídos em D-PBS para congelar blastocistos produzidos *in vitro*. Obtiveram índices de re-expansão de 16,7% e 19,6%, respectivamente, as 24 e 48 horas após a descongelação e taxa de eclosão de 12%, após 72 horas de cultivo. Os autores sugeriram que os baixos índices encontrados estavam associados com a origem dos embriões.

Assim sendo, a sobrevivência do embrião ao processo de criopreservação depende do tipo de crioprotetor, do estágio de desenvolvimento embrionário, bem como do método utilizado para produzir o embrião *in vivo* ou *in vitro* (7).

Vitrificação

Desde o desenvolvimento e aplicação comercial da congelação de embrião, novas tecnologias têm sido desenvolvidas nos últimos anos, na tentativa de melhorar os índices de viabilidade e aperfeiçoar as técnicas. Além dos métodos rápidos de congelação, foram desenvolvidos métodos denominados ultra-rápidos, como o da vitrificação, na qual os meios de criopreservação sofrem uma passagem direta do estado líquido para um estado vitrificado e amorfo, sem a ocorrência da cristalização dos meios. Isso é possível pelo uso de soluções crioprotetoras com alto grau de viscosidade e da grande velocidade de congelação por imersão direta dessas soluções no nitrogênio, a partir da temperatura ambiente (7, 12, 17).

A vitrificação é a técnica de criopreservação mais recentemente desenvolvida e que permite acelerar significativamente o processo de criopreservação do embrião sem a utilização de um congelador programável de alto custo, tornando assim o processo rápido, prático e menos oneroso que a congelação tradicional (13); porém, ainda são escassos os estudos com esta técnica para algumas espécies domésticas, principalmente no Brasil (12).

Um dos primeiros trabalhos de vitrificação, desenvolvido por Ishimori (22), consistiu em colocar os embriões murídeos, por dois minutos, em meio de equilíbrio composto de 12,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e de 12,5% de EG. Durante esse período, os embriões foram submetidos a cinco lavagens, em microgotas. Em seguida, foram transferidos, por 30 segundos, para o meio de vitrificação composto de 25% de DMSO + 25% de EG, procedimento que ocorreu concomitantemente com o envase dos embriões nas palhetas de 0,25 mL. As palhetas foram inicialmente expostas ao vapor de nitrogênio para em seguida serem imersas no mesmo. A descongelação foi efetuada em banho-maria a 20°C. Como meio de diluição foi utilizada uma solução de 0,5 M de sacarose. Imediatamente após a descongelação, as palhetas foram fortemente agitadas. Os embriões permaneceram, inicialmente, por 5 minutos nas palhetas para, então, serem novamente hidratados em meio de cultivo.

Diversas metodologias de vitrificação têm sido desenvolvidas, empregando diferentes soluções crioprotetoras, tipos de suporte para acondicionamento dos embriões e velocidades de resfriamento, dificultando a comparação dos dados entre experimentos (23). Atualmente, a maioria das soluções de vitrificação apresenta crioprotetores diluídos em solução tamponada de fosfato, acrescida de 0,5 mM de piruvato de sódio, 3,3 mM de glicose e 20% de soro fetal bovino (12).

Ishimori (22), testando seis soluções compostas por dois crioprotetores diluídos em 50% de DPBS, constatou que a solução que apresentou os melhores resultados foi aquela com 25% de EG e 25% de DMSO. Já Vajta et al. (24) e Lazar et al. (25), utilizaram o mesmo protocolo de vitrificação, deixando os embriões bovinos por três minutos em solução composta por 7,5% de EG e 7,5% de DMSO, dissolvidos em TCM-199 suplementado com 20% de soro fetal bovino. Após esse tempo, os embriões foram colocados em solução de 16,5% de EG, 16,5% de DMSO e 0,5 M de sacarose, diluídos em TCM-199, na qual foi realizado um banho rápido e, em seguida, transferidos para outra gota de mesma composição, na qual foram vitrificados. Os embriões foram envasados, através de capilaridade, em palhetas francesas de 0,25 mL, previamente estiradas (“Open Pulled Straw” – OPS) e imersos no nitrogênio líquido em tempo não superior a 25 segundos.

Pilla (26) avaliou o efeito da trealose e EG na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vivo*. A vitrificação de embriões com 3,0 M de EG ou 3,0 M de EG, acrescido de 0,3 M de trealose, ambos em solução de manutenção, não resultou em diferença estatística entre os tratamentos, observando o mesmo índice de gestação, em torno de 14,5%. Contudo, Werlich (23) avaliou a taxa de eclosão de blastocistos vitrificados em soluções contendo a associação de dois crioprotetores intracelulares (grupo 1 -20% EG + 20% DMSO, grupo 2 - 25% EG + 25% glicerol e grupo 3 - 20% EG + 20% Propilenoglicol), constatando que os grupos 1 e 3 apresentaram resultados superiores.

Outra associação foi testada por Mezzalira et al. (27), os quais avaliaram a influência da citocalasina B (micotoxina que se liga às proteínas, dando estabilidade ao citoesqueleto, aparentemente por aumentar a elasticidade das estruturas), associada ao EG, DMSO e a trealose, como crioprotetores na vitrificação de oócitos e embriões bovinos produzidos *in vitro*; porém, os resultados indicaram que a exposição à citocalasina B não produziu efeito benéfico na vitrificação de oócitos ou blastocistos.

Os principais fatores limitantes da vitrificação são o estresse osmótico e a toxicidade química do crioprotetor, os quais causam danos às células embrionárias (28); porém, o equilíbrio é buscado por meio de rápidas taxas de resfriamento, que reduzem a toxicidade dos crioprotetores e diminuem o tempo de exposição da célula às temperaturas críticas (29).

A aceleração da curva de queda da temperatura na vitrificação tem como principal vantagem a diminuição da necessidade de uma concentração muito alta de crioprotetor na solução de vitrificação, conseqüentemente, diminui os danos osmóticos e tóxicos, reduzindo a

ocorrência de injúrias de resfriamento, pois o embrião passa rapidamente para o estado vítreo. Uma das possibilidades para acelerar a queda da temperatura é a utilização de suportes físicos para o embrião que permitam um menor volume de solução crioprotetora e um contato direto entre o embrião e o nitrogênio líquido (24, 30).

Diversas metodologias utilizando pequenos volumes de solução de vitrificação foram desenvolvidas, melhorando a técnica convencional em palhetas de 0,25 mL (31), como o método OPS e suas variações (24), método em grades de microscopia eletrônica de transmissão (32), “Cryoloops” (33), método em micropipeta de vidro – GMP (34), método em superfície sólida de vitrificação - SSV (35), método das microgotas (36), método da hemipalhetta (“hemi-straw”) (37), método do “Mcgill Cryoleaf” (38), entre outros. A utilização da maioria desses suportes promove o contato direto do embrião com nitrogênio líquido, fato esse que, segundo alguns autores (39, 40), tem a desvantagem de provocar a contaminação das estruturas com patógenos.

Método convencional de envase em palheta de 0,25mL

Esta técnica de vitrificação baseia-se na utilização de palheta francesa de 0,25 mL (31) e uma taxa de resfriamento com velocidade de aproximadamente 2000°C por minuto (24). Naitana et al. (31), utilizando esta metodologia, vitrificaram embriões ovinos dividindo a palheta em cinco colunas. Após o êmbolo, foi feita uma coluna de solução contendo 0,5 M de sacarose, seguida de uma pequena bolha de ar. A segunda coluna era pequena e composta pelo meio de vitrificação, seguida de uma bolha de ar. A terceira coluna com o meio de vitrificação e embrião, era seguida por duas bolhas de ar com uma coluna contendo solução crioprotetora entre elas. A quinta coluna era constituída de solução de 0,5 M de sacarose. A palheta era lacrada e imediatamente imersa em nitrogênio líquido, não demorando mais do que 30 segundos para a imersão do início da palheta, sendo o restante da mesma submerso lentamente.

Utilizando palhetas francesas, mas deixando-as por um minuto expostas ao vapor de nitrogênio antes de serem submersas neste, Mezzalira et al. (41) vitrificaram vinte e sete embriões bovinos produzidos *in vivo*. Após a desvitrificação os embriões foram transferidos para receptoras previamente sincronizadas resultando em cinco gestações. Donnay et al. (42), com a mesma metodologia e utilizando a porcentagem de re-expansão e eclosão como indicativos de sobrevivência, obtiveram taxas de 67% de re-expansão e 53% de eclosão, após 72 horas de cultivo de blastocistos vitrificados e desvitrificados.

A descongelação do embrião é realizada deixando a palheta em banho-maria durante alguns segundos, com o tempo e a temperatura variando de acordo com cada grupo de pesquisa. Donnay et al. (42) deixaram a palheta em banho-maria por 10 segundos a uma temperatura de 37°C. Mezzalira et al. (41) desvitrificaram as palhetas por 5 segundos ao ar e, em seguida, por 20 segundos em banho-maria a 35°C. Após a descongelação, o embrião foi colocado em uma placa de petri, onde foi reidratado e novamente envasado para ser inovulado.

Método de vitrificação em OPS

Este método foi descrito por Vajta et al. (24) e consiste em uma modificação na palheta de 0,25 mL, para que ocorra uma diminuição de seu diâmetro e, conseqüentemente, do volume que comporta.

Após remoção dos tampões de algodão, as palhetas de 0,25 mL foram aquecidas sobre uma placa quente e puxadas manualmente até que seu diâmetro interno diminuísse de 1,7 para 0,8 mm, aproximadamente, e a espessura da parede na parte central diminuísse de 0,15 para

0,07 mm. Posteriormente, as palhetas foram resfriadas ao ar e cortadas no ponto mais estreito por uma lâmina (43).

Aproximadamente 1 a 2 μL do meio de vitrificação contendo o embrião são introduzidos na extremidade estreita da palheta por efeito capilar. A extremidade contendo o embrião é imediatamente imersa no nitrogênio líquido, solidificando a coluna líquida sem que haja dispersão da solução. Com o diâmetro e a espessura da parede diminuídos para aproximadamente metade do tamanho original, a taxa de resfriamento é aumentada, sendo acima de 20.000°C/minuto. Esta alta velocidade de resfriamento diminui os danos causados ao embrião, como por exemplo, o rompimento da zona pelúcida e dos blastômeros. Diante disso, o uso das palhetas de OPS minimiza os danos tóxicos e osmóticos causados ao embrião devido à possibilidade de se utilizar uma menor concentração de crioprotetor e uma rápida velocidade de congelamento (24).

A descongelamento é realizada colocando-se a ponta estreita da palheta diretamente em contato com o meio “holding” na placa de petri. Em 2 a 3 segundos o meio vitrificado retorna ao estado líquido e o meio “holding” entra na palheta; mediante efeito da sedimentação, os embriões saem da palheta para o meio (24). Os mesmos autores, após vitrificarem e descongelarem embriões bovinos utilizando o método de OPS observaram taxas de 70% e 94% de embriões viáveis no dia 6 e 7, respectivamente. A taxa de re-expansão dos blastocistos no dia 8 foi de 81%. Os índices são significativamente superiores aos apresentados anteriormente para o método convencional de vitrificação.

Lopatarova et al. (43) utilizando embriões bovinos produzidos *in vivo*, compararam dois métodos de criopreservação: vitrificação em OPS e congelamento pela técnica de transferência direta. Não observaram diferença significativa entre as taxas de gestação obtidas. Encontraram taxa de prenhez, a partir de embrião grau I vitrificado ou congelado, de 55,1% e de 54,1%, respectivamente, e de embrião grau II vitrificado ou congelado de 36,4% e 32,9%, respectivamente, demonstrando que os métodos são viáveis e que a qualidade do embrião afetou diretamente os resultados. Da mesma forma, Pereira (44), utilizando a mesma tecnologia desenvolvida por Vajta et al. (24) e vitrificando embriões bovinos produzidos *in vitro*, verificou uma taxa de eclosão de 70,5% e 81,3%, respectivamente, para embriões vitrificados (D7), após 48 e 72 horas de cultivo.

Técnica de vitrificação em grades de microscopia eletrônica de transmissão

Este protocolo de vitrificação foi desenvolvido por Martino et al. (32) para criopreservação de oócitos bovinos, porém, pode também ser aplicado em embriões. Consistiu na utilização de grades de microscopia eletrônica de transmissão como suporte físico para os embriões ou oócitos, mantendo as estruturas em um pequeno volume de solução crioprotetora. As grades foram mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido, atingindo taxas de resfriamento superiores a 20.000° C por minuto. Os embriões ficaram por 20 segundos expostos a uma solução crioprotetora constituída de 5,5 M de EG e 1 M de sacarose. Após este período, 10 a 15 embriões foram transferidos para a superfície de cada grade de microscopia, em um pequeno volume de solução crioprotetora, aproximadamente 1 μL . Para diminuir o volume do meio de vitrificação, o lado inferior das grades foi colocado sobre um papel filtro visando retirar o excesso de solução. Imediatamente, as grades foram imersas no nitrogênio líquido, sendo o tempo transcorrido da exposição dos embriões aos crioprotetores até a imersão das grades em nitrogênio líquido não superior a 30 segundos (32).

A desvitrificação e a reidratação dos embriões foram feitas em cinco etapas. As grades saíam diretamente do nitrogênio líquido para uma placa de petri contendo meio de cultivo com 0,5 M de sacarose, a uma temperatura de 37°C. Após cinco segundos, os embriões passaram para o segundo banho, também em solução contendo 0,5 M de sacarose, onde

permaneceram por 1 minuto. Na terceira e quarta etapas, as estruturas permaneceram por mais um minuto em cada uma das soluções compostas de 0,25 e 0,125 M de sacarose, respectivamente. No quinto estágio, após permanecerem por 5 minutos em meio de cultivo, os embriões estavam aptos para serem transferidos (32).

Seguindo esta metodologia, Park et al. (45) observaram taxas de eclosão de 67,8% para blastocistos bovinos expandidos e de 95% para blastocistos em eclosão, após desvitrificação e 48 horas de cultivo.

Técnica de vitrificação em “Cryoloop”

Desenvolvido por Lane et al. (30), este método consistiu em usar como suporte físico para congelar os embriões mamíferos, um pequeno laço de náilon de aproximadamente 20 µm de largura e 0,05 – 0,07 mm de diâmetro, permitindo a adição de um volume de aproximadamente 1 a 2 µL de solução crioprotetora. Os embriões ficaram por 1 a 3 minutos expostos a uma solução composta de 10% de EG, 10% de DMSO, sendo então retirados e colocados na solução de vitrificação constituída de 20% de EG, 20% de DMSO, 10 mg/mL de ficoll e 0,65 M de sacarose, por 20 segundos, sendo então colocados no “Cryoloop”. O laço foi previamente submerso na solução de vitrificação para que uma fina película de crioprotetor fosse formada em seu interior para abrigar os embriões. Após a transferência das estruturas para o laço, este foi imediatamente colocado em contato com o nitrogênio líquido, não demorando mais do que 45 segundos para os embriões serem vitrificados.

A descongelação foi realizada colocando-se o “Cryoloop” na placa de petri em contato com a solução de desvitrificação e reidratação previamente aquecida. A fina película de crioprotetor se desfaz, e os embriões submergem na solução (30). Os autores obtiveram uma taxa de eclosão de 80% em blastocistos bovinos produzidos *in vitro*. Demonstrando a eficiência da técnica, Begin et al. (33) vitrificaram embriões caprinos produzidos *in vivo* e observaram 100% de taxa de sobrevivência após a desvitrificação.

Método de vitrificação em micropipetas de vidro - GMP

Esta técnica, relatada por Cho et al. (34), teve como objetivo substituir a palheta de OPS por uma palheta que não flutuasse em nitrogênio líquido e que tivesse os diâmetros interno e externo menores, melhorando as taxas de condutividade de temperatura durante o resfriamento.

As micropipetas de vidro foram produzidas a partir de capilares de vidro distendidos com o auxílio de um equipamento específico. Os capilares de vidro foram aquecidos e estirados até que seu diâmetro na parte central diminuísse de 1,0 para 0,3 mm. Então, as micropipetas foram resfriadas ao ar e com a utilização de um instrumento com ponta de diamante, o vidro foi cortado em sua extremidade mais estreita (34).

Comparando a palheta de OPS com a micropipeta de vidro, Cho et al. (34) constataram que o diâmetro externo da OPS era de 1,7 mm e o interno de 0,8 mm, comportando um volume de 2,68 mm³. A micropipeta de vidro possuía 1,0 mm de diâmetro externo e 0,3 mm de diâmetro interno, sendo possível armazenar um volume 19 vezes menor do que o volume armazenado na palheta de OPS, ou seja, um volume de aproximadamente 0,14 mm cúbicos. Os mesmos autores vitrificaram blastocistos bovinos em OPS e em GMP, em solução contendo 16,5% de EG e 16,5% de DMSO, em meio “holding”. O processo de envase, vitrificação e desvitrificação utilizado foi o mesmo descrito por Vajta et al. (24), ocorrendo apenas modificações nas soluções, conforme descrito acima no parágrafo. A taxa de re-expansão verificada foi significativamente maior para embriões vitrificados em GMP

(90,4%) do que para os embriões vitrificados em OPS (79,6%). Porém, não foi observada diferença significativa entre as taxas de eclosão dos dois grupos.

Com um peso de 0,098 g, a micropipeta de vidro não flutuou quando colocada em nitrogênio líquido, o que é melhor para o processo de congelamento. Outra grande vantagem foi a alta velocidade de congelamento, devido à rápida condutividade de temperatura e ao mínimo volume de solução crioprotetora utilizado; entretanto, esta técnica ainda possui algumas limitações, devido à dificuldade de produção da micropipeta e à sua fragilidade, sendo freqüentemente quebrada ou rachada próximo à extremidade mais fina, com perda dos embriões (34).

Vitrificação em Superfície Sólida de Vitrificação - SSV

Dinnyés et al. (35), na tentativa de melhorar os índices de sobrevivência de oócitos ao processo de criopreservação, descreveram esse método, o qual pode também ser utilizado na vitrificação de embriões.

A superfície sólida que serve de base para a congelamento, é formada por um cubo oco de metal que tem sua superfície forrada por uma folha de papel alumínio. O cubo foi colocado dentro de uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido para que ficasse parcialmente submerso e com sua superfície um pouco acima do nível do nitrogênio, para atingir temperaturas entre -150 e -180°C. Em seguida, os oócitos foram depositados juntamente com a solução de vitrificação na superfície do cubo, formando uma gota de 1 a 2 µL de solução, sendo a gota vitrificada instantaneamente (35). Para serem armazenadas por longos períodos, as gotas vitrificadas foram colocadas em criotubos de 1 mL previamente resfriados em nitrogênio (35).

Begin et al. (33) utilizando esse método para vitrificar embriões caprinos produzidos *in vivo*, expuseram os embriões durante 12 a 15 minutos a uma solução de equilíbrio contendo 4% de EG diluído em TCM-199, a uma temperatura de 34°C. Após este período, os embriões passaram por três banhos rápidos em gotas de solução de vitrificação, composta de 35% de EG, 5 % de polivinilpirrolidona (PVP) e 0,4 M de trealose, diluídos em TCM-199. A desvitrificação foi realizada em solução a 0,3 M de trealose em TCM-199, aquecida a 37°C por 3 minutos. A taxa de sobrevivência embrionária observada foi de 39%.

Método de vitrificação em Microgotas

Desenvolvido por Papis et al. (36), este método permitiu a vitrificação dos oócitos ou embriões utilizando apenas a gota formada pela solução de vitrificação como suporte para as estruturas.

Os oócitos e a solução de vitrificação foram depositados em uma pipeta de Pasteur inclinada e a cerca de 15 cm de altura do nível do nitrogênio líquido. O conteúdo da pipeta deslizou em seu interior e formou uma gota de aproximadamente 6 µL, em sua extremidade. A gota caiu diretamente em nitrogênio líquido e foi vitrificada instantaneamente. Depois de vitrificadas, as gotas foram retiradas, com o auxílio de uma pinça e colocadas em criotubos de 0,75 mL, previamente resfriados, para armazenamento. A solução de descongelamento foi composta de 2 mL de TCM-199 adicionado de 20% de SFB; as gotas foram retiradas do nitrogênio e colocadas em uma placa de petri contendo a solução (36). Utilizado por Landa et al. (46) para vitrificar embriões de camundongo, no estágio de 8 células, este método demonstrou ser bastante eficiente. Após a desvitrificação e cultivo, 83% dos embriões atingiram o estágio de blastocisto.

Método de vitrificação em hemi-palhetas (“Hemi Straw”)

Esse procedimento de vitrificação foi desenvolvido por Vanderzwalmen et al. (37) para criopreservar blastocistos humanos produzidos *in vitro*. A técnica consistiu na utilização de uma palheta de 0,25 mL, cortada ao meio, no sentido longitudinal, como suporte físico para os embriões.

Os embriões foram expostos por dois minutos a uma solução de equilíbrio composta de 10% de etilenoglicol e 10% de DMSO. Logo após esse período, os embriões foram transferidos para a solução de vitrificação contendo 20% de etilenoglicol, 20% de DMSO, 25 μ M de ficoll e 0,75 M de sacarose, por 30 segundos. Em seguida, no máximo dois blastocistos e 0,3 μ L de meio foram transferidos para a extremidade de uma hemi-palheta, imediatamente mergulhada em nitrogênio líquido. Após a imersão, a hemi palheta foi colocada no interior de uma palheta previamente resfriada, lacrada e retornada para o nitrogênio líquido (37).

A descongelação dos embriões foi realizada em soluções contendo concentrações decrescentes de sacarose (0,5; 0,25 e 0,125 M), dissolvidas em PBS, à temperatura de 37° C. Os resultados em termos de sobrevivência embrionária foram semelhantes às outras técnicas de vitrificação, podendo ser uma alternativa para criopreservar embriões (37).

Método de vitrificação utilizando o “McGill Cryoleaf”

O objetivo de Huang et al. (38) foi testar o suporte “McGill Cryoleaf”, até então utilizado para criopreservar oócitos, na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Durante o processo de criopreservação, as estruturas foram expostas, durante cinco minutos, a um meio de equilíbrio composto de 7,5% de EG e 7,5% de propanodiol. Transcorrido esse tempo, os blastocistos foram transferidos para o meio de vitrificação, composto de 15% de EG, 15% de propanodiol e 0,5 M de sacarose, onde permaneceram por 45 a 60 segundos. A seguir, foram imediatamente colocados no “McGill Cryoleaf” e mergulhados no nitrogênio líquido.

A solução de desvitrificação continha 1,0 M de sacarose e os blastocistos foram descongelados a 37° C por um minuto. Então, foram transferidos para os meios de diluição constituídos de 0,5 e 0,25 M de sacarose, por 3 minutos, cada. A taxa de sobrevivência foi de 100% e não houve diferença estatística significativa entre a taxa de eclosão de blastocistos vitrificados e não vitrificados.

CONCLUSÃO

A criopreservação de embriões bovinos é uma técnica que apesar de contar com protocolos bem definidos, com bons índices de sobrevivência embrionária e aplicação comercial, ainda possui muito campo para a pesquisa visando aumentar essas taxas.

Existem alguns fatores inerentes ao embrião que afetam a criopreservação, como o estágio de desenvolvimento, a espécie a qual pertence e o método de produção (*in vivo* ou *in vitro*), que ainda não estão completamente elucidados. Os fatores da criopreservação propriamente ditos, como tipo de crioprotetor, velocidade da curva de congelamento, tipo de suporte físico para o embrião, formam outro grande leque de alternativas que influenciam na manutenção da viabilidade de embriões submetidos ao processo de criopreservação.

Quando se trata de embriões produzidos *in vitro*, a dificuldade de estabelecer um protocolo padrão é mais evidente. Além de mudanças nos fatores citados, ainda podem ser

feitas modificações nos meios de maturação e cultivo para melhorar a qualidade morfológica e estrutural destes embriões, tornando-os mais resistentes à criopreservação.

A vitrificação tem se mostrado uma boa alternativa para criopreservar embriões produzidos *in vitro*, devido a sua rápida passagem para o estágio vítreo e, principalmente, o seu baixo custo, pois não necessita de congeladores biológicos que controlam a curva de temperatura.

Diante do exposto ficam evidentes as dificuldades de estabelecer um protocolo padrão de criopreservação de embriões. Mesmo assim, vale ressaltar que atualmente a técnica é viável não só para embriões bovinos, como também, de outras espécies.

REFERÊNCIAS

1. Rumpf R, Brandão DO, Pereira DC, Correia GA. Vitrificação de embriões produzidos *in vitro* [Workshop]. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2004.
2. Dinnyes A, Meng O, Polgar Z, Boonkusol DE, Sonfai T. Criopreservação de embrião de mamíferos. *Acta Sci. Vet.* 2006; 34: 171-90.
3. Mezzalira AE, Vieira AD. Criopreservação de oócitos e embriões bovinos. *Acta Sci. Vet.* 2006; 34: 191-6.
4. Dobrinsky JR. Cellular approach to cryopreservation of Embryos. *Theriogenology.* 1996; 51: 17-26.
5. Manzur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science.* 1970; 168: 939-49.
6. Fahy GM, Levy DI, Ali SE. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions and utility of vitrification solution. *Cryobiology.* 1987; 24: 196-213.
7. Dobrinsky JR. Advancements in cryopreservation of domestical animal embryos. *Theriogenology.* 2002; 57: 285-302.
8. Reichenbach HD, Oliveira MAL, Lima PF, Filho ASS, Andrade JCO. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonçalves PBD, Figueredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São Paulo: Livraria Varela; 2001. p.127-77.
9. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62: 3-22.
10. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology.* 2000; 53: 47-58.
11. Rumpf R, Bem AR, Peixer MAS, Dode MAN, Souza RV, Silva AEDF, et al. Transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina [Manual]. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2005.
12. Green RE. Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos [Monografia]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2005.
13. Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. *Theriogenology.* 1991; 35: 109-24.
14. Oliveira ECS. Efeito de diferentes diluidores sobre a criopreservação do sêmen canino [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.
15. Leibo SPA. One-Step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology.* 1984; 21: 767-90.

16. Stringfellow DA, Seidel SM. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3ª ed. Illinois: Savoy; 1998.
17. Reichenbach HD, de Oliveira MAL, de Lima PF, Filho ASS, Andrade JCO; Tenório Filho F, et al. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonçalves PBD, Figueredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2008. p.201-40.
18. Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. Biol Reprod. 2001; 65: 1127-34.
19. Nedambale TL, Dinnyés A, Groen W, Dobrinsky JR, Tian XC, Yang X. Comparasion on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and criopreserved by slow freezing or vitrification. Theriogenology. 2004; 62: 437-49.
20. Dochi O, Imai K, Takakura H. Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. Anim Reprod Sci. 1995; 38: 179-85.
21. Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. Theriogenology. 2006; 65: 1551-62.
22. Ishimori H, Takahashi Y, Kanagawa H. Viability of vitrified mouse embryos using various cryoprotectants mixtures. Theriogenology. 1992; 37: 481-7.
23. Werlich DE, Barreta MH, Martins LT, Vieira AD, Moraes NA, Mezzalira A. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso do nitrogênio super-resfriado. Acta Sci. Vet. 2006; 34: 77-82.
24. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Dev. 1998; 51: 53-8.
25. Lazar L, Spak J, Dávid V. The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. Theriogenology. 2000; 54: 571-8.
26. Pilla LFC. Congelamento ultra-rápido de embriões bovinos com etilenoglicol associado ou não a trealose [dissertação]. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2005.
27. Mezzalira A, Viera AD, Barbieri DP, Machado MF, Thaler Neto A, Bernadi ML, et al. Vitrification of oocytes and *in vitro* produced bovine embryos exposed to cytochalasin B. Braz J Vet Res Anim Sci. 2002; 39: 260-5.
28. Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland MP, 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. 2002; 74: 35-44.
29. Arav A, Shehu D, Mattioli M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. J Reprod Fertil. 1993; 99: 353-8.
30. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. Nat Biotechnol. 1999; 17: 1234-6.
31. Naitana S, Ledda S, Loi P, Leoni G, Bogliolo L, Dattena M, et al. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. Anim Reprod Sci. 1997; 48: 247-56.

32. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod.* 1996; 54: 1059-69.
33. Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL. Cryopreservation of goats oocytes and in vivo derived embryos 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology.* 2003; 59: 1839-50.
34. Cho SK, Cho SG, Bae IH, Park CS, Kong IK. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette. *Anim Reprod Sci;* 73: 151-8.
35. Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod.* 2000; 63: 513-8.
36. Papis K, Shimizu M, Izaike Y. Factors affecting the survivability of bovines oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology;* 54: 651-8.
37. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaert V, Bollen N, Roosendaal E, et al. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. *Hum Reprod.* 2003; 18: 1504-11.
38. Huang JYJ, Chung J, Tan SL, Chian R. High survival and hatching rates following vitrification of embryos at blastocyst stage: a bovine model study. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14: 464-70.
39. Bielanski A, Nadin-Davis S, Sapp T, Lutze-Wallace C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. *Cryobiology.* 2000; 40: 110-6.
40. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Van Der Ven H. Vitrification of mouse pronuclear embryos after polar body biopsy without direct contact with liquid nitrogen. *Fertil Steril.* 2005; 84: 1011-6.
41. Mezzalira A, Vieira DA, da Silva LFA, Kajiyama VY. Congelamento ultra – rápido de embriões bovinos. *Rev. Ciênc. Agroveter.* 2002; 2: 115-9.
42. Donnay I, Auquier P, Kaidi S, Carolan C, Lonergan P, Mermillod P, et al. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Anim Reprod Sci.* 1998; 52: 93-104.
43. Lopatarova M, Cech S, Holy L, Dolezel R. The effect of vitrification in open pulled straws on pregnancy rates after transfer of *in vivo* produced bovine embryos. *Vet Med.* 2006; 51: 454-60.
44. Pereira DC. Avaliação de diferentes sistemas de cultivo na produção in vitro de embriões bovinos [dissertação]. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária de Brasília, Universidade de Brasília; 2003.
45. Park SP, Kim EY, Kim DY, Park NH, Won YS, Yoon SH, et al. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Hum Reprod.* 1999; 14: 2838-43.
46. Landa V, Tepla O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. *Folia Biol (Praha).* 1990; 36: 153-8.

Recebido em: 04/04/2008

Aceito em: 29/06/2009