



Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual

Cryopreservation of livestock embryos: cryobiological principles and current status

L. Dalcin, C.M. Lucci¹

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Campus Darci Ribeiro, Brasília, DF, Brasil.

¹Correspondência: cmLUCCI@unb.br

Resumo

A criopreservação de embriões tornou-se prática essencial na rotina de programas de transferência de embriões, sendo uma ferramenta valiosa para a pecuária, pois evita perdas de germoplasma e proporciona segurança sanitária, além de auxiliar na preservação de espécies ameaçadas de extinção. O efeito da criopreservação em embriões mamíferos reduz as taxas de sobrevivência, principalmente quando são utilizados embriões em estádios iniciais de desenvolvimento, levando a consideráveis danos morfológicos e funcionais. Contudo, a extensão da crioinjúria é altamente variável e dependente da espécie, estágio de desenvolvimento e origem do embrião (produzido *in vivo* ou *in vitro*) no momento da criopreservação.

Palavras-chave: congelamento, crioinjúria, crioprotetor, vitrificação.

Abstract

Embryo cryopreservation has become an essential practice in the routine of embryo transfer programs and is considered a valuable tool to the livestock production, it also avoids germplasm losses, improves sanitary security and preserves species at risk of extinction. The effect of cryopreservation in mammalian embryos leads to a decrease in the survival rate especially during early stages of development causing important structural and morphological damages. However the extension of the cryoinjury is highly variable and depends on the species, origin of the embryo (in vivo or in vitro production) and its developmental stage at the moment of cryopreservation.

Keywords: cryoinjury, cryoprotectants, freezing, vitrification.

Introdução

O objetivo da congelamento de embriões é a preservação do metabolismo celular em estado de quiescência, para que este possa ser restabelecido após um período de estocagem, continuando seu desenvolvimento normal. Isso é obtido por meio do armazenamento em baixas temperaturas, que induz à parada da atividade enzimática, do metabolismo e da respiração celular, possibilitando a conservação de células por tempo indeterminado (Gordon, 1994).

O primeiro relato da sobrevivência de embriões mamíferos criopreservados foi obtido por Whittingham, em 1971, após a congelamento de embriões de camundongos. Posteriormente, sucessivas pesquisas foram realizadas com sucesso em diferentes espécies, como bovina (Wilmut e Rowson, 1973), ovina (Willadsen et al., 1974), caprina (Bilton e Moore, 1976), equina (Yamamoto et al., 1982), humana (Trounson e Mohr, 1983) e suína (Kashiwazaki et al., 1991).

Na exploração pecuária, a eficiência da aquisição de embriões com alto valor genético também depende do sucesso de técnicas de estocagem em baixas temperaturas. Sendo assim, a criopreservação tornou-se particularmente importante no desenvolvimento do comércio internacional de embriões, uma vez que somente estruturas congeladas sob determinadas condições podem ser comercializadas (Mapletoft e Stookey, 1998).

A maioria dos embriões mamíferos é congelada pelos métodos convencionais, utilizando-se baixas concentrações de crioprotetores com lenta permeabilidade e refrigeração controlada por equipamento de congelamento programável (Vajta e Nagy, 2006). Outro método de criopreservação é a vitrificação, que dispensa a utilização de equipamentos programáveis (Ali e Shelton, 1993), proporciona rapidez e menor tempo de exposição ao crioprotetor, além de prevenir a formação de cristais de gelo pelo uso de elevadas concentrações do crioprotetor e taxas de refrigeração (Papadopoulos et al., 2002).

Estudos com criopreservação de embriões mostram que sua susceptibilidade a crioinjúrias varia de acordo com o estágio de desenvolvimento, espécie e origem do embrião (Ali e Shelton, 1993; Dobrinsky, 1996; Baril et al., 2001). Outros trabalhos relatam também a interferência do tipo e da concentração do crioprotetor, relacionando-os à embriotoxicidade e permeabilidade celular (Széll e Shelton, 1986; Ali e Shelton, 1993; McGinnes et al., 1993).



Esta revisão tem por objetivo descrever mecanismos e consequências dos principais métodos de criopreservação (congelamento lento e vitrificação) sobre a viabilidade embrionária, além de relatar possibilidades e perspectivas de seu uso em diferentes espécies de animais de produção.

Princípios criobiológicos e crioprotetores

O princípio fundamental do processo de criopreservação é baseado na necessidade de remoção máxima da água intracelular antes da criopreservação, para que não ocorra a formação de grandes cristais de gelo e danos celulares, possibilitando a retomada do metabolismo celular após seu armazenamento em baixas temperaturas (Vajta e Kuwayama, 2006).

Durante a congelamento, a temperatura declina e a água do meio se cristaliza, o que leva ao aumento da concentração de solutos extracelulares. Assim, quando a velocidade de congelamento é lenta, a célula sofre desidratação. Porém, quando essa velocidade é rápida, a célula não perde água o suficiente, ocorrendo formação de gelo intracelular, que promove danos mecânicos e pode determinar a morte celular (England, 1993; Reichenbach et al., 2002). À medida que a velocidade de congelamento aumenta, a taxa de sobrevivência celular também aumenta, até que seja alcançada uma relação ideal em que a taxa de sobrevivência será máxima. Posteriormente, esta taxa declina, formando uma parábola (Mazur, 1984).

Alterações celulares referentes à formação de cristais de gelo foram primeiramente relatadas por Mazur em 1963, quando mostrou que a velocidade de saída da água intracelular está relacionada ao aumento da concentração do soluto extracelular, determinando o equilíbrio osmótico. Assim, a velocidade de congelamento determinará o grau de retração celular e a presença ou ausência de cristais (Mazur, 1984).

A variação do tempo de congelamento é um fator importante para a formação e o crescimento dos cristais de gelo durante a congelamento celular, podendo esse tempo ser expresso como lento, moderado, rápido e ultrarrápido (Leibo, 2008). De lenta a moderada, a congelamento possui taxas de resfriamento altamente controladas até atingir temperaturas de -35 a $-80^{\circ}\text{C}/\text{min}$, seguida pelo mergulho em nitrogênio líquido. Já uma queda de temperatura rápida ou ultrarrápida ocorre ao redor de $200^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou acima de 20.000 - $100.000^{\circ}\text{C}/\text{min}$, respectivamente (Vajta e Nagy, 2006).

Segundo Karow (2001), o processo de congelamento ocorre da seguinte maneira: quando a 0°C em pressão atmosférica, a água pura encontra-se parcialmente congelada, sendo este seu ponto de equilíbrio de congelamento, em que cristais de gelo e água coexistem em equilíbrio e de forma homogênea (nucleação homogênea). Uma vez iniciada a cristalização, ocorre liberação de energia em forma de calor (calor latente de fusão), o que aumenta a temperatura necessária para atingir o ponto de equilíbrio de congelamento (0°C), e quase toda a água líquida é convertida em gelo. A adição de solutos à água faz com que sua temperatura de congelamento se torne mais baixa, retardando o aparecimento dos cristais e diminuindo a temperatura em que se dá o equilíbrio de congelamento para uma temperatura inferior a 0°C . Tendo em vista que materiais biológicos possuem diversos solutos e sais intra e extracelulares, seu ponto de fusão é menor do que o da água pura, e à medida que o solvente progride para congelamento, há aumento da concentração dos solutos na porção líquida remanescente, alterando a osmolaridade intra e extracelular.

Crioprotetores são adicionados visando ao aumento da viscosidade da solução e maior equilíbrio osmótico entre solução e material biológico. Estas substâncias têm baixo peso molecular e são usadas com o intuito de impedir efeitos nocivos às células referentes à formação de cristais de gelo e ao choque osmótico. Elas podem permanecer no interior da célula ou fora dela e são divididas em duas categorias: permeáveis e não permeáveis. Os primeiros correspondem a pequenas moléculas que penetram pela membrana celular, formam pontes de hidrogênio com moléculas de água intracelulares e diminuem a temperatura de congelamento, prevenindo a formação dos cristais de gelo. Como exemplos, têm-se o propilenoglicol, glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), entre outros (Vajta e Nagy, 2006). Os crioprotetores não permeáveis permanecem no meio extracelular, retirando a água livre e levando à desidratação do espaço intracelular por efeito osmótico (Vajta e Nagy, 2006; Pereira e Marques, 2008). Estes crioprotetores são usados em combinação com os permeáveis visando aumentar a concentração destes no interior das células, prevenir a formação de grandes cristais de gelo, diminuir a concentração necessária do crioprotetor permeável e, conseqüentemente, sua toxicidade (Pereira e Marques, 2008).

Após a intensa utilização do glicerol como crioprotetor permeável, fez-se uso do DMSO na congelamento de algumas células e tecidos (Woods et al., 2004). No entanto, atualmente, o etilenoglicol é o crioprotetor mais utilizado, tendo sido primeiramente testado em embriões mamíferos no ano de 1977, por Miyamoto e Ishibashi, que encontraram taxas de sobrevivência de embriões de ratos equivalentes ou maiores que as dos embriões criopreservados em DMSO (McGinnis et al., 1993). Estudos recentes continuam mostrando a superioridade do etilenoglicol na criopreservação de embriões de diversas espécies, como bovina (Sommerfeld e Niemann, 1999; Martinez et al., 2002; Mucci et al., 2006), suína (Berthelot et al., 2007; Cuello et al., 2007), caprina (Guignot et al., 2006) e ovina (Garcia-Garcia et al., 2006; Bettencourt et al., 2009).

As taxas de reaquecimento também influenciam a viabilidade celular e dependem das condições em que foi realizada a criopreservação. Além disso, o resultado obtido do processo de descongelamento depende também



da re-hidratação celular e da remoção do crioprotetor, momento em que o espécime já se encontra em temperatura fisiológica (Woods et al., 2004). Ao se submeter a amostra criopreservada à temperatura de reaquecimento, pode ocorrer a formação de grandes cristais de gelo pelo crescimento dos pequenos núcleos de cristais, normalmente formados durante a criopreservação, o que resulta em dano celular decorrente da recristalização (Brockbank et al., 2001).

Assim como nos eventos da criopreservação, na descongelação também ocorre o fluxo de água e crioprotetor através da membrana celular. A mudança dinâmica do volume celular é um importante fator relacionado à possibilidade de dano mecânico e ruptura de membrana. Solutos impermeáveis, como os açúcares, oferecem meios de diluição adicional para que seja prevenida a excessiva turgidez osmótica durante a remoção do crioprotetor na descongelação (Woods et al., 2004). Por isso, são usadas concentrações elevadas de crioprotetores não permeáveis nesta fase, sendo o mais comum a sacarose. Porém, podem ser utilizados outros dissacarídeos, como a galactose e a trealose (Pereira e Marques, 2008). Além disso, existem diferentes polímeros para este fim, como polivinilpirrolidona, polietilenoglicol, ficoll, dextran e álcool polivinílico, mas somente o ficoll vem sendo utilizado, geralmente em associação ao etilenoglicol e à sacarose (Woods et al., 2004).

Apesar de serem os principais métodos de criopreservação de embriões mamíferos, a congelação lenta e a vitrificação diferem grandemente quanto aos seus princípios e ferramentas. Enquanto a congelação lenta se baseia em um delicado balanço osmótico em máquina programável visando à redução de temperatura, a vitrificação consiste em uma rápida substituição da água intracelular pelo crioprotetor, para que, desta maneira, o estado vítreo seja alcançado e as chances de formação de cristais de gelo sejam nulas.

Congelação lenta de embriões

Também conhecida como método de congelação clássica, tradicional ou de equilíbrio, a congelação lenta vem sendo usada desde 1972, quando foi desenvolvida por Whittingham. A partir de então, esta técnica foi padronizada e largamente utilizada no âmbito comercial e industrial. Tal método pode ser interpretado como uma tentativa de criar um delicado balanço entre vários fatores que determinam a formação de cristais de gelo, fraturas, danos tóxicos e osmóticos, permitindo trocas entre os meios extra e intracelular sem que ocorram sérios efeitos osmóticos e deformidades celulares (Vajta e Kuwayama, 2006).

A congelação lenta consiste em um pré-equilíbrio e exposição dos embriões à solução crioprotetora, para que estes sejam, então, submetidos à queda de temperatura em máquina programável. Em uma primeira etapa, a temperatura atinge uma fase de pré-congelação a -7°C , momento em que ocorre a liberação do calor latente de fusão e o prejudicial aumento da temperatura, o qual é evitado pelo *seeding*, por meio do contato da palheta com um objeto metálico pré-refrigerado em nitrogênio líquido. Após sua manutenção em um período de equilíbrio de 10 a 15 minutos, os embriões são congelados lentamente, com redução de temperatura entre $0,3$ e $1^{\circ}/\text{min}$, até atingir -30 a -35°C . Neste momento, tem-se a formação de gelo extracelular da água pura e consequente aumento da concentração do soluto extracelular. Ao se encontrar suficientemente desidratada, a célula terá uma concentração elevada de solutos capaz de impedir a cristalização do gelo, momento em que ocorre imersão da célula em nitrogênio líquido (Vajta e Nagy, 2006).

O processo de descongelação necessita de um rápido aquecimento para impedir que pequenos cristais de gelo, não prejudiciais às células, fundam-se e cresçam, tornando-se danosos. Após o aquecimento, os crioprotetores são removidos por meio da passagem do material biológico em soluções com concentração decrescente de crioprotetores impermeáveis (Woods et al., 2004). Quando o espécime é exposto a estas soluções, a quantidade de crioprotetor presente no interior das células diminui gradativamente e o embrião é re-hidratado na solução de manutenção (Rall, 1992).

O método lento de congelação não é somente um processo longo, mas também requer um dispendioso aparato de equipamentos de congelação e grande volume de nitrogênio líquido. Apesar de possuir reconhecidas limitações quanto à prevenção na formação de cristais de gelo intracelular, esta técnica tornou-se altamente padronizada com considerável aplicação comercial e industrial. Além disso, oferece parâmetros precisos e meios comerciais prontos para utilização na congelação e descongelação, tornando possível sua realização após um período de treinamento curto (Vajta e Nagy, 2006).

Vitrificação de embriões

A vitrificação foi primeiramente introduzida na criopreservação de embriões de camundongos por Rall e Fahy (1985). Em anos subsequentes, foram publicados diversos trabalhos com oócitos e embriões de diversas espécies, explorando possibilidades de combinações, adição e remoção de crioprotetores, além de novos métodos e formas de armazenamento (Vajta e Kuwayama, 2006).

Esta técnica pode ser considerada um método de criopreservação em que a formação de cristais de gelo é totalmente eliminada. Nela, a solidificação é atingida pelo aumento extremo da viscosidade e não pela cristalização, chegando diretamente à fase vítreo (Massip, 2001; Yavin e Arav, 2007). A vitrificação permite a passagem pela zona crítica de temperatura de maneira rápida, o que impede o desenvolvimento de injúrias



ocasionadas pela formação dos cristais de gelo. Contudo, a concentração do crioprotetor necessária, em torno de 40% da solução, traz efeitos tóxicos e hipertônicos para o espécime (Massip, 2001), aumentando o risco de injúrias causadas pelo choque osmótico e pela toxicidade celular (Vajta e Nagy, 2006).

A probabilidade de sucesso na vitrificação está ligada a três fatores: viscosidade da amostra, taxas de refrigeração-aquecimento e volume da amostra. Estes fatores são independentes, e os dois primeiros estão relacionados direta e positivamente à probabilidade de vitrificação, isto é, quanto maior a viscosidade e a taxa de refrigeração, maior será a chance de vitrificação. No entanto, o volume da amostra tem relação inversa, e sua diminuição aumenta a probabilidade de sucesso (Yavin e Arav, 2007).

As palhetas de 0,25 mL, inicialmente utilizadas na vitrificação, foram rapidamente substituídas pela OPS (*open pulled straw*), que possui metade do diâmetro em sua porção final, possibilitando o uso de menor volume e envase do embrião por capilaridade (Vajta et al., 1998; Vajta e Nagy, 2006). Outra alternativa é a micropipeta de vidro, que, após seu aquecimento e estiramento, passou a ter aplicação semelhante à OPS, porém com maior fragilidade no armazenamento pelo risco de quebra (Kong et al., 2000). Na busca de volumes ainda menores, diversos métodos já foram testados no intuito de maximizar a taxa de refrigeração. Dentre eles estão as grades de microscopia eletrônica (Martino et al., 1996), *crioloops* e *criotops* (Kuwayama, 2007).

Em condições de pressão atmosférica normal, há a formação de uma bolsa de vapor ao redor da amostra, que pode diminuir a eficiência da refrigeração do espécime (Yavin e Arav, 2007). A formação de vácuo e a consequente diminuição do ponto de ebulição do nitrogênio de -196°C para -200 a -205°C , ou a vitrificação em superfície sólida (VSS), eliminam totalmente a formação do vapor ao redor da amostra, aumentando, assim, a eficiência da vitrificação (Vajta e Kuwayama, 2006).

Durante o aquecimento de embriões vitrificados, pode haver a formação de cristais de gelo intracelular, processo conhecido como desvitrificação. Isso ocorre em situações em que a concentração do crioprotetor permeável é insuficiente. Essa concentração deve ser superior a 20%, porém limitada, para diminuir os danos decorrentes do efeito tóxico da solução (Jin et al., 2008).

O risco na transmissão de doenças pelo contato direto com nitrogênio líquido e a impossibilidade da transferência direta de embriões vitrificados foram os inconvenientes iniciais que dificultaram o uso da vitrificação. Entretanto, foram encontradas soluções práticas que contornaram estes problemas e estão sendo aplicadas com sucesso (Vajta e Nagy, 2006), por exemplo: o acondicionamento das OPS em palhetas de 0,5mL lacradas (Kuwayama, 2007) ou o uso de nitrogênio líquido filtrado e esterilizado, que eliminam a possibilidade do contato entre o espécime e possíveis contaminantes (Vajta et al., 1998). Já a transferência direta de embriões vitrificados é possível por meio de sua deposição diretamente em palhetas de 0,25 mL contendo solução de sacarose (Baril et al., 2001; Isachenko et al., 2003).

De modo geral, a vitrificação requer o estabelecimento de um sistema seguro de refrigeração e minimização ou eliminação dos efeitos nocivos dos crioprotetores. Contudo, resultados estatísticos de desenvolvimento embrionário mostram que os efeitos cumulativos tóxicos e osmóticos da vitrificação não são maiores do que aqueles causados pela congelação lenta (Kuwayama, 2007).

Eficiência da criopreservação de embriões

Independentemente do método utilizado, os embriões sofrem consideráveis danos durante a criopreservação. A formação de cristais de gelo, os efeitos tóxicos da solução crioprotetora e o choque osmótico são os maiores efeitos adversos do crioprocédimento. A extensão da injúria depende de fatores que incluem: tamanho e forma das células, permeabilidade de membrana e sensibilidade dos embriões (Vajta e Kuwayama, 2006).

A perda de água intracelular depende da permeabilidade de membrana celular, a qual é determinada por sua composição e área, bem como pela temperatura e pela diferença de concentração de um determinado soluto encontrada entre o meio extra e o intracelular. Os crioprotetores diferem entre si quanto à permeabilidade celular, sendo que diferentes estádios de desenvolvimento embrionário influenciarão na permeabilidade ao mesmo crioprotetor. Além disso, embriões em um mesmo estágio, mas de diferentes espécies, terão diferenças na permeabilidade a um mesmo crioprotetor (Leibo, 2008).

Temperaturas abaixo da temperatura corporal fisiológica, porém acima de 0°C , são definidas como “zona de perigo” e acarretam injúrias da refrigeração, consideradas irreversíveis (Zeron et al., 1999). As membranas celulares são danificadas devido à fase de transição da membrana lipídica, período durante a refrigeração em que ocorrem alterações estruturais e funcionais na membrana (Yavin e Arav, 2007).

Vajta e Nagy (2006) postularam que temperaturas entre 15 e -5°C estão relacionadas a danos de gotas lipídicas citoplasmáticas e microtúbulos, as quais prejudicarão as divisões meióticas subsequentes. Injúrias de microtúbulos são consideradas reversíveis, enquanto prejuízos às gotas lipídicas contribuem para a morte dos embriões criopreservados. Por outro lado, temperaturas entre -5 e -80°C correspondem à principal fase de injúrias causadas por cristais de gelo, enquanto entre -50 e -150°C podem ocorrer fraturas da zona pelúcida ou danos no citoplasma. Temperaturas abaixo de -150°C correspondem à fase de menor injúria, sendo o aquecimento accidental a causa mais provável de ocorrência de danos.



A sensibilidade à refrigeração também é dependente da espécie, das condições de refrigeração e do estágio de desenvolvimento embrionário (Leibo e Devireddy, 2007). Contudo, independentemente da origem e espécie, embriões no estágio de blastocisto tendem a ser mais resistentes à criopreservação, quando comparados àqueles nos estádios iniciais de clivagem e mórulas. Esta maior tolerância é observada tanto na congelação lenta quanto na vitrificação (Martinez e Matkovic, 1997; Garcia-Garcia et al., 2005).

Embriões suínos produzidos *in vivo* ou *in vitro* (PIVE) e embriões bovinos PIVE são bastante sensíveis a temperaturas abaixo de 14°C. Este aumento considerável da criossensibilidade está relacionado a diferentes concentrações lipídicas e proteicas (Massip, 2001). Todavia, embriões bovinos e ovinos produzidos *in vivo* apresentam maior tolerância aos procedimentos da criopreservação (Pollard e Leibo, 1994).

Embriões bovinos

O primeiro nascimento de bezerro proveniente de embrião criopreservado foi relatado por Wilmot e Rowson, em 1973, que submetem embriões bovinos produzidos *in vivo* à congelação clássica. Atualmente, esta técnica já se encontra bem estabelecida com a utilização de etilenoglicol a 1,5M, atingindo taxas de sobrevivência embrionária, prenhez e nascimento próximas às alcançadas por embriões frescos (Hasler, 2003).

No decorrer dos anos, outros trabalhos aprimoraram as técnicas de criopreservação aplicadas também a embriões PIVE (Cho et al., 2002). Pesquisas envolvendo a criopreservação destes embriões buscam na vitrificação alternativas para contornar limitações relacionadas à maior criossensibilidade deste tipo de embrião (Sommerfeld e Niemenn, 1999; Cho et al., 2002; Mozzaquatro, 2004; Varago et al., 2006; Gómez et al., 2008; Block et al., 2009).

A maior sensibilidade dos embriões PIVE é devido ao fato de estes apresentarem grande conteúdo lipídico (Loneragan et al., 2001). Desta forma, modificações nas técnicas de criopreservação não são suficientes para melhorar as taxas de sobrevivência, havendo necessidade também de alterações na composição dos meios de cultivo embrionário para que embriões PIVE se desenvolvam sem que haja acúmulo exacerbado de lipídio intracelular (Leibo e Loskutoff, 1993).

Ao comparar a taxa de sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos PIVE, após vitrificação em etilenoglicol e glicerol com diferentes concentrações de sacarose, Martinez et al. (2002) obtiveram o melhor resultado com a adição de 0,1M de sacarose na solução de vitrificação, com taxas de 66,6% de eclosão e 50% de prenhez. Contudo, Werlich et al. (2006) constataram a superioridade da associação do etilenoglicol com DMSO ou 1,2 propanodiol, quando comparada ao uso do glicerol na vitrificação em OPS, resultando em 53,5%, 52,8% e 38,9% de eclosão, respectivamente. Estes mesmos autores também relataram o uso do nitrogênio super-refrigerado (-210°C), pela submissão ao vácuo, sobre a taxa de eclosão, não ocorrendo diferença significativa entre os tratamentos.

Ainda na criopreservação de embriões PIVE, Mucci et al. (2006) tiveram melhores taxas de sobrevivência 72 horas após o reaquecimento utilizando a vitrificação em OPS com a combinação de etilenoglicol e DMSO, quando comparada com a congelação clássica em etilenoglicol, obtendo taxas de 43% e 12%, respectivamente.

Além das variações já mencionadas relacionadas à criossensibilidade, embriões bovinos de diferentes raças também mostram variações nas taxas de sobrevivência. Visintin et al. (2002) encontraram embriões da raça Holandesa com morfologia mais preservada do que os da raça Nelore após avaliação ultraestrutural. Segundo estes autores, uma possível causa desta diferença é que embriões de *Bos taurus* apresentam gotículas de gordura maiores e em maior número do que as observadas nos embriões de *Bos indicus*.

Apesar do avanço nas pesquisas, a criopreservação de embriões bovinos PIVE ainda encontra muitas limitações, principalmente ao envolver suas consequências sobre a expressão gênica desses embriões, já alterada em decorrência das condições de maturação ovocitária, fecundação e cultivo *in vitro* (Jeong et al., 2009).

Embriões ovinos

Assim como nas demais espécies que utilizam a criopreservação de embriões para fins comerciais ou de pesquisa, na espécie ovina os métodos comumente utilizados para criopreservação de embriões são congelação lenta e vitrificação. Contudo, a prática de colheita de embriões ovinos, seguida da criopreservação, é feita em menor escala do que a de bovinos (Isachenko et al., 2003), devido ao alto custo da técnica em comparação ao valor do animal (Baril et al., 2001).

As maiores taxas de sobrevivência após criopreservação são obtidas com blastocistos produzidos *in vivo*, congelados em etilenoglicol, principalmente em comparação a mórulas congeladas em glicerol, que podem atingir taxa de eclosão de somente 4,2% (Cocero et al., 1996). Em contrapartida, embriões ovinos colhidos em estádios iniciais (2-4, 5-8 e 9-12 células) e cultivados até o estágio de blastocisto para a congelação em etilenoglicol apresentam sobrevivência de 66,1%, sendo que, ao serem colhidos no estágio de blastocisto, alcançam taxas de eclosão de até 83,7% (Garcia-Garcia et al., 2005).

Ao congelarem, em etilenoglicol, embriões colhidos em estágio de 2-12 células até mórula, Garcia-



Garcia et al. (2006) atingiram taxa de sobrevivência *in vitro* de 23,1%, enquanto embriões colhidos e congelados em fase de blastocisto tiveram taxa de 83,7%, mostrando que o efeito da congelação não foi significativo, pois não houve diferença em comparação à sobrevivência *in vitro* dos embriões frescos colhidos na fase de blastocisto (92,5%). Outro estudo com embriões ovinos congelados em etilenoglicol pelo método lento obteve taxas de prenhez de 73%, enquanto a implantação de embriões frescos atingiu taxa similar, com 74% de gestação (McGinnis et al., 1993).

A vitrificação de embriões ovinos PIVE em etilenoglicol e glicerol tem se mostrado satisfatória, chegando a taxas de 70% e 50% de sobrevivência embrionária e gestação, respectivamente (Dattena et al., 2000; Martinez et al., 2006). Dattena et al. (2004) obtiveram taxas de prenhez de 57 e 50%, respectivamente, com o uso de etilenoglicol e glicerol ou etilenoglicol, DMSO e sacarose na vitrificação de embriões PIVE, sem diferença significativa entre os dois grupos. No mesmo estudo, ao vitrificarem embriões produzidos *in vivo*, os autores observaram que as taxas de prenhez também não diferiram entre si, alcançando 75 e 71%, respectivamente.

A vitrificação, quando comparada ao método de congelação lenta, mostra resultados semelhantes na criopreservação de embriões ovinos (Dattena et al., 2000, 2004; Green, 2007), sendo que até hoje a maior eficiência é alcançada com o uso do etilenoglicol como crioprotetor e embriões nos estádios de mórula e blastocisto (Garcia-Garcia et al., 2006).

Embriões caprinos

Técnicas de criopreservação de embriões vêm sendo desenvolvidas também na espécie caprina (Baldassarre, 2007). O método de maior utilização é a congelação lenta, que, por ser onerosa, aumenta a relação custo-benefício. Contudo, técnicas de vitrificação em conjunto com a inovulação direta estão sendo pesquisadas para maior aplicabilidade e redução dos custos em programas de transferência de embriões caprinos (Guignot et al., 2006).

O primeiro relato de sucesso na congelação de embriões caprinos foi feito por Bilton e Moore em 1976, utilizando glicerol. Posteriormente, o etilenoglicol substituiu os outros crioprotetores por suas características menos nocivas às células. A taxa de gestação nesta espécie se encontra entre 30 e 70%, dependendo da qualidade embrionária. Semelhante a outras espécies, embriões caprinos produzidos *in vivo* geralmente são congelados em etilenoglicol a 1,5M (Fonseca, 2006).

Com o sucesso da vitrificação de embriões caprinos, iniciada por Yuswiati e Holtz, em 1990, foi possível realizar maior variedade de técnicas de criopreservação em embriões desta espécie. Resultados animadores conseguidos posteriormente por El-Gayar e Holtz (2001) mostraram a superioridade da vitrificação em OPS sobre o método de congelação lenta. Blastocistos de cabras superovuladas congelados em glicerol resultaram em 58% de prenhez, enquanto dentre as 14 receptoras inovuladas com embriões vitrificados em etilenoglicol e DMSO, 100% estavam prenhes e 93% pariram cabritos saudáveis.

Guignot et al. (2006) estudaram o efeito da inovulação direta e indireta sobre as taxas de prenhez após congelação ou vitrificação de embriões caprinos produzidos *in vivo*. Os embriões congelados inovulados pelo método indireto apresentaram taxa de prenhez de 81%, enquanto a inovulação direta de embriões congelados em etilenoglicol com e sem sacarose resultaram em 66 e 41% de prenhez, respectivamente. Com relação aos vitrificados em palhetas de 0,25 mL, as taxas de prenhez foram de 56 e 29% após inovulação direta ou indireta, respectivamente. Já a vitrificação em OPS com inovulação direta teve taxa de 43% de gestação aos 21 dias após inovulação.

Comparando a criotolerância de embriões PIVE de caprinos e ovinos, Traldi et al. (1996) mostraram que blastocistos ovinos possuem menor taxa de sobrevivência que os caprinos (41 vs. 60%) após vitrificação utilizando glicerol e etilenoglicol. Houve também a inovulação em receptoras previamente sincronizadas, possibilitando a obtenção das taxas de prenhez e nascimento, sendo que nas cabras foi de 30 e 45%, e nas ovelhas de 9 e 15%, respectivamente.

Com o avanço e aprimoramento das técnicas de criopreservação de embriões caprinos, será possível a redução dos custos em programas comerciais de TE, melhorando a relação custo-benefício e sua aplicação em pesquisas que envolvam embriões de maior criossensibilidade, como embriões PIVE, biopsiados e clonados.

Embriões equinos

Logo após sua chegada ao útero, a mórula equina (160 µm de diâmetro) cresce rapidamente, dificultando a obtenção de embriões menores que 300 µm em programas de TE. Tendo em vista que a capacidade de um embrião sobreviver à criopreservação depende também do seu tamanho, quanto maior seu volume, maior será o tempo necessário para a aquisição do equilíbrio osmótico na presença do crioprotetor (Alvarenga et al., 2007).

Outro fator limitante à sua criopreservação é que, no estágio de blastocisto, há a formação da cápsula embrionária entre a zona pelúcida e as células do trofoblasto. Esta cápsula é uma camada acelular de mucina



glicoproteica, resistente à solubilização química, enzimática e à remoção mecânica (Betteridge, 2007), que interferirá negativamente sobre as taxas de sobrevivência após a criopreservação. Portanto, a presença da cápsula embrionária, associada à grande blastocele, dificulta a difusão dos crioprotetores e a criopreservação dos embriões equinos (Alvarenga et al., 2007).

O primeiro produto viável proveniente do uso de embriões criopreservados foi obtido por Yamamoto et al., em 1982, quando atingiram 9% de prenhez. Pesquisas subsequentes concluíram que embriões com diâmetros iguais ou inferiores a 300µm têm resultados satisfatórios sobre a taxa de gestação, variando entre 64% (Hochi et al., 1996) e 80%, enquanto embriões com diâmetro superior a 300 µm resultam em taxas de gestação bastante inferiores (MacLellan et al., 2002).

Hochi et al. (1996) compararam o efeito dos crioprotetores etilenoglicol e glicerol na congelamento de embriões equinos produzidos *in vivo* e, após inovulação direta em receptoras, obtiveram taxas de prenhez de 25 e 37,5%, respectivamente. Ao adicionar 0,1M de sacarose na solução de etilenoglicol, a taxa de gestação aos 15 dias foi de 63,6%, sendo que o grupo de embriões frescos alcançou 70% de prenhez, mostrando a eficácia da congelamento de embriões em etilenoglicol adicionado de sacarose após o período de equilíbrio no meio crioprotetor e subsequente congelamento em máquina programável.

Em estudo mais recente utilizando inovulação direta de embriões vitrificados com a combinação de etilenoglicol e glicerol em palhetas de 0,25 mL, Eldridge-Panuska et al. (2005) obtiveram as maiores taxas de gestação após inovulação de embriões criopreservados com diâmetro inferior a 300 µm, atingindo taxa de gestação de 62%, sendo que os embriões com maior diâmetro não resultaram em formação de vesícula embrionária.

Oberstein et al. (2001) avaliaram blastocistos equinos vitrificados em OPS ou *crioloop* utilizando a associação entre os crioprotetores etilenoglicol e DMSO. Comparando-os com a congelamento lenta em etilenoglicol, obtiveram porcentagens de células vivas equivalentes a 51 e 48% após as respectivas técnicas de vitrificação, e equivalente a 74% após congelamento lenta. Este resultado evidencia diferença significativa na viabilidade celular após vitrificação ou congelamento de embriões equinos produzidos *in vivo*.

Comparando a congelamento em glicerol com a vitrificação em OPS com etilenoglicol e DMSO, Moussa et al. (2005) apresentaram resultados referentes ao número de células totais, células mortas e embriões entrando na fase-S em um período de três horas de cultivo *in vitro* após reaquecimento. Não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados, apesar de os embriões vitrificados mostrarem maior variação na quantidade de células mortas do que os congelados.

Por se tratar de uma tecnologia bastante viável para as demais espécies, a vitrificação necessita de mais experimentos avaliando taxas de sobrevivência *in vivo*, como taxa de prenhez e nascimento, para obtenção de resultados mais consistentes.

Embriões suínos

Em comparação a outras espécies domésticas, o uso da criopreservação de embriões suínos é significativamente menor. Isso se deve a fatores referentes à própria anatomia e fisiologia do trato reprodutivo da fêmea, os quais dificultam as práticas de TE em âmbito comercial, e à grande sensibilidade embrionária a baixas temperaturas, tornando difícil a sua criopreservação. Contudo, a importância da criopreservação de embriões suínos vem sendo reconhecida para a preservação de material genético e distribuição internacional de linhagens genéticas e raças (Dinnyes et al., 2006).

Trabalhos envolvendo a criopreservação de embriões suínos buscam contornar limitações conhecidas inerentes à sua fisiologia (Cuello et al., 2004, 2007; Men et al., 2005; Berthelot et al., 2007; Fujino et al., 2008), como a grande quantidade de lipídio presente no citoplasma destes embriões (Dinnyes et al., 2006).

Nas células embrionárias, as gotas lipídicas formam complexos com elementos do citoesqueleto, membranas e organelas, tornando-se essenciais ao metabolismo energético durante a maturação, a fecundação e o início do desenvolvimento embrionário. No entanto, quando embriões são refrigerados a temperaturas abaixo de 15°C, ocorre a separação de fases na membrana lipídica, levando a danos estruturais irreversíveis e à maior dificuldade na criopreservação destes embriões, especialmente utilizando-se os métodos tradicionais de congelamento (Dinnyes et al., 2006).

No intuito de superar danos relacionados à criossensibilidade, diversas estratégias foram desenvolvidas. Entre elas estão técnicas de remoção lipídica (Nagashima et al., 1994), desenvolvimento de métodos de vitrificação (Cuello et al., 2004; Fujino et al., 2008) e estabilização do citoesqueleto (Dobrinsky et al., 2000). A primeira estratégia é baseada na polarização dos lipídios por centrifugação e em sua remoção por pipeta de sucção, o que possibilita o aumento de 60% sobre a tolerância embrionária à refrigeração. A retirada mecânica de lipídios viabiliza o uso da congelamento lenta, resultando em taxas de 30 a 60% de sobrevivência embrionária (Dinnyes et al., 2006).

No anseio de atingir melhores taxas de sobrevivência, foram desenvolvidos diversos meios para a realização da vitrificação, buscando concentrações mais adequadas de crioprotetores e diferentes métodos. Dentre diversos tipos, Cuello et al. (2004) compararam o sistema de OPS, OPS superfina (SOPS) e Vit-Master®,



que utiliza a SOPS como palheta, em embriões produzidos *in vivo*. A classe de embriões de melhor taxa de eclosão ao final de 96 horas de cultivo *in vitro* para o primeiro e o segundo tratamento foi de blastocisto expandido (72,7 e 83,3%, respectivamente), sendo que, com a utilização do Vit-Master®, os blastocistos na fase inicial obtiveram melhor taxa de eclosão (79%). Mórulas tiveram resultados inferiores, com 25,4, 29,4 e 26,8% de eclosão após reaquecimento, respectivamente para os diferentes sistemas testados.

Em trabalho subsequente, Cuello et al. (2007) utilizaram o mesmo método de vitrificação em Vit-Master® com embriões colhidos nos estádios de 2-4 células, obtendo taxa de 75% de blastocisto após reaquecimento e cultivo *in vitro*, porém esta se mostrou inferior ao grupo fresco, que atingiu 89,1%. Todavia, a taxa de eclosão entre os grupos também mostrou diferença significativa com taxas de 33,6% nos embriões vitrificados e 47,5% nos frescos.

Berthelot et al. (2007) testaram diferentes concentrações de etilenoglicol e DMSO na vitrificação em OPS de embriões produzidos *in vivo* e não observaram diferenças significativas quanto à sobrevivência. O melhor resultado geral foi de 67%, com o uso de 16,5% de ambos os crioprotetores. Porém, não houve sobrevivência de mórulas após a vitrificação em nenhum dos tratamentos, sendo que o grupo composto por blastocistos e blastocistos expandidos mostrou as melhores taxas de sobrevivência *in vitro* (75%).

Juntamente ao desenvolvimento e à aplicação de técnicas de vitrificação de embriões suínos, a estabilização do citoesqueleto por meio da despolimerização dos filamentos de actina tem sido utilizada para minimizar os danos osmóticos consequentes das concentrações elevadas dos crioprotetores. Dobrinsky et al. (2000) conseguiram taxa de 90% de eclosão em cultivo *in vitro* de blastocistos vitrificados em glicerol após tratamento prévio com citocalasina-b, sendo que o grupo não tratado resultou em apenas 28% de eclosão. Neste mesmo trabalho, foi observado que a arquitetura do citoesqueleto apresentou padrão de repolarização nos embriões estabilizados similar ao apresentado por embriões frescos.

Há poucas informações sobre a criopreservação de embriões suínos PIVE. Estes embriões apresentam diferenças em relação aos produzidos *in vivo*, e sua criotolerância é menor. Men et al. (2005) concluíram que o uso de soro fetal bovino no meio de PIVE resultou em embriões com melhores características morfológicas e maior quantidade de células viáveis após vitrificação, quando comparado ao uso de albumina sérica bovina.

Apesar da existência de nascimento de leitões provenientes de embriões frescos, congelados (Nagashima et al., 1995) e vitrificados (Dobrinsky et al., 2000), ainda não houve relato sobre a criopreservação de embriões suínos PIVE que tenham resultado em prenhez, ressaltando a necessidade de mais pesquisas relacionadas tanto aos métodos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, quanto às técnicas de vitrificação.

Considerações finais

De modo geral, todos os embriões sofrem consideráveis danos durante o processo de criopreservação e aquecimento. Mesmo com a grande variabilidade destas técnicas, a criopreservação pode provocar diferentes injúrias celulares, independentemente da espécie do embrião. Apesar de algumas injúrias serem aparentemente reversíveis, as taxas de sobrevivência e de prenhez obtidas com o uso de embriões criopreservados ainda são inferiores às obtidas com embriões frescos.

A proposta dos procedimentos de criopreservação é minimizar os danos celulares e contribuir para que ocorra maior regeneração embrionária após o reaquecimento. Estratégias para reduzir estas injúrias incluem redução do volume criopreservado, modificação da relação superfície celular/volume e melhora da criotolerância pela suplementação com vários aditivos, como estabilizadores do citoesqueleto (Pereira e Marques, 2008). Portanto, à medida que se avance no conhecimento sobre princípios e técnicas criobiológicas, será possível a identificação de pontos cruciais para o desenvolvimento de métodos que provoquem menores crioinjúrias, tornando-as totalmente reversíveis ou até mesmo nulas ao desenvolvimento embrionário subsequente.

Referências bibliográficas

- Ali J, Shelton J. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil*, v.99, p.471-477, 1993.
- Alvarenga MA, Fernandes CB, Alvarenga FCL. Cryopreservation of equine embryos. *Acta Sci Vet*, v.35 (supl. 3), p.799-809, 2007.
- Baldassarre H. Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.274-282, 2007.
- Baril G, Traldi AL, Cognié Y, Lebeouf B, Beckers JF, Mermillod P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, v.56, p.299-305, 2001.
- Berthelot F, Venturi E, Cognie J, Furstoss V, Botte FM. Development of ops vitrified pig blastocysts: effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. *Theriogenology*, v.68, p.178-185, 2007.
- Bettencourt EMV, Bettencourt CM, Silva JNCE, Ferreira P, Matos CP, Oliveira E, Romão RJ, Rocha A, Sousa M. Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved *in vivo* produced ovine embryos.



- Theriogenology*, v.71, p.947-958, 2009.
- Betteridge KJ.** Equine embryology: an inventory of unanswered questions. *Theriogenology*, v.68s, p.s9-s21, 2007.
- Bilton RJ, Moore NW.** *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust J Biol Sci*, v.9, p.125-129, 1976.
- Block J, Bonilla L, Hansen PJ.** Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos *in vitro* following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology*, v.71, p.1063-1071, 2009.
- Brockbank KGM, Covault JC, Taylor MJ.** Cryobiology and cryopreservation. In: Brockbank KGM, Covault JC, Taylor MJ. *Cryopreservation manual: a guide to cryopreservation techniques*. Marietta, OH: Thermo Electron Corporation, 2001. 24p.
- 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 (GMP). *Anim Reprod Sci*, v.73, p.151-158, 2002.
- Cocero MJ, Sebastian AL, Barragan ML, Picazo RA.** Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology*, v.33, p.502-507, 1996.
- Cuello C, Gil MA, Alminana C, Sanchez-Osorio J, Parrilla J, Caballero I, Vazquez JM, Roca J, Rodriguez-martinez H, Martinez EA.** Vitrification of *in vitro* cultured porcine two-to-four cell embryos. *Theriogenology*, v.68, p.258-264, 2007.
- Cuello C, Gil MA, Parrilla I, Tornel J, Vazquez JM, Roca J, Berthelot F, Martinat-botte F, Martinez EA.** Vitrification of porcine embryos at various developmental stages using different ultra-rapid cooling procedures. *Theriogenology*, v.62, p.353-361, 2004.
- Dattena M, Accardo C, Pilichia S, Isachenkob V, Maraa L, Chessac B, Cappai P.** Comparison 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.
- Dattena M, Ptak G, Loi P, Cappair P.** Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, v.53, p.1511-1519, 2000.
- Dinnyes A, Meng Q, Polgar Z, Boonkuso D, Somfai T.** Criopreservação de embriões de mamíferos. *Acta Sci Vet*, v.34, supl.1, p.171-190, 2006.
- Dobrinsky JR.** Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, v.45, p.17-26, 1996.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA.** Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod*, v.62, p.564-570, 2000.
- Eldridge-Panuska WD, Caracciolo di Brienzab V, Seidel Jr GE, Squiresa EL, Carnevale EM.** Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, v.63, p.1308-1319, 2005.
- El-Gayar M, Holtz W.** Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J Anim Sci*, v.79, p.2436-2438, 2001.
- England GCW.** Cryopreservation of dog semen: a review. *J Reprod Fertil*, v.47, p.243-255, 1993.
- Fonseca JF.** Alguns aspectos da transferência de embriões em caprinos. *Acta Sci Vet*, v.34, supl 1, p.65-70, 2006.
- Fujino F, Kojima T, Nakamura Y, Kobayashi H, Kikuchi K, Funahashi H.** Metal mesh vitrification (MMV) method for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology*, v.70, p.809-817, 2008.
- Garcia-Garcia MR, Gonzalez-Bulnes A, Dominguez V, Veiga-Lopes A, Cocero MJ.** Culture of early stage ovine to blastocyst enhances survival rate after cryopreservation. *Theriogenology*, v.63, p.2233-2242, 2005.
- Garcia-Garcia MR, Gonzalez-Bulnes A, Dominguez V, Veiga-Lopes A, Cocero MJ.** Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. *Cryobiology*, v.55, p.108-113, 2006.
- Gómez E, Rodríguez A, Munõz M, Caamanõ JN, Hidalgo CO, Morán E, Facal N, Díez C.** Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*, v.69, p.1013-1021, 2008.
- Gordon I.** Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. In: Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB international, 1994. p.293-328.
- Green RE.** *Viabilidade de embriões ovinos vitrificados ou congelados submetidos às técnicas direta e indireta de inovação*. 2007. 60f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2007.
- Guignot F, Bouttier A, Baril G, Salvetti P, Pignon P, Beckers JF, Touze JL, Cognie J, Traldi AS, Cognie Y, Mermillod P.** Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology*, v.66, p.1004-1011, 2006.
- Hasler JF.** The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.79, p.245-264, 2003.
- Hochi S, Maruyama K, Oguri N.** Direct transfer of equine blastocysts in the presence of ethylene glycol frozen-thawed and sucrose. *Theriogenology*, v.46, p.1217-1224, 1996.
- Isachenko V, Alabart JL, Dattena M, Nawroth F, Cappai P, Isachenko E, Cocero MJ, Oliveira J, Roche**



- A, Accardo C, Krivokharchenko A, Folch J.** New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*, v.59, p.1209-1218, 2003.
- Jeong WJ, Cho SJ, Lee HS, Deb GK, Leea YS, Kwon TH, Kong IK.** Effect of cytoplasmic lipid content on *in vitro* developmental efficiency of bovine ivp embryos. *Theriogenology*, v.72, p.584-589, 2009.
- Jin B, Kusanagi K, Ueda M, Seki, Valdez JRDM, Edashige K, Kasai M.** Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. *Cryobiology*, v.56, p.233-240, 2008.
- Karow AM.** Cryobiology 2001 for mammalian embryologists. Disponível em: www.xytextinternational.com/pdf/cryobiology.pdf. Acessado em: 28 jul 2009.
- Kashiwazaki N, Ohtani S, Miyamoto K, Ogawa S.** Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196°C. *Vet Rec*, v.16, p.256-257, 1991.
- Kong IK, Lee SI, Cho SG.** Comparison of open pulled straw (ops) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*, v.53, p.1817-1826, 2000.
- Kuwayama M.** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. *Theriogenology*, v.67, p.73-80, 2007.
- Leibo SP.** Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, v.69, p.37-47, 2008.
- Leibo SP, Devireddy R.** Effect of chilling on gametes and embryos. *Cryobiology*, v.55, p.325, 2007. Resumo.
- Leibo SP, Loskutoff NM.** Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, v.39, p.81-94, 1993.
- Lonergan P, Rizos D, Ward F, Boland MP.** Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev*, v.41, p.427-437, 2001.
- MacLellan LJ, Carnevale EM, Silva CMA, Mccue PM, Seidel GE, Squires EL.** Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-b and/or trypsin. *Theriogenology*, v.58, p.717-720, 2002.
- Mapletoft RJ, Stookey JM.** Procedimentos sanitários gerais e considerações de bem estar associados com a produção *in vivo* de embriões. In: Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3.ed. Champaign, IL: IETS, 1998. 180p.
- Martinez AG, Matkovic M.** Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, v.49, p.1039-1049, 1997.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP.** Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. *Biol Reprod*, v.54, p.1059-1069, 1996.
- Martinez AG, Valcárcel A, Furnus CC, Matos DG, Iorio G, Heras MA.** Cryopreservation of *in vitro*-produced ovine embryos. *Small Rumin Res*, v.63, p.288-296, 2006.
- Martinez AG, Valcárcel A, Heras MA, Matos DG, Furnus C, Brogliatti G.** Vitrification of *in vitro* produced bovine embryos: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Anim Reprod Sci*, v.73, p.11-21, 2002.
- Massip A.** Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Domest Anim*, v.36, p.49-55, 2001.
- Mazur P.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol*, v.247, p.125-142, 1984.
- McGinnis LK, Duplantis SC, Youngs CR.** Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. *Anim Reprod Sci*, v.30, p.273-280, 1993.
- Men H, Agca Y, Critser ES, Critser JK.** Beneficial effects of serum supplementation during *in vitro* production of porcine embryos on their ability to survive cryopreservation by open pulled straw vitrification. *Theriogenology*, v.64, p.1340-1349, 2005.
- Moussa M, Bersinger I, Doligez P, Guignot F, Duchamp G, Vidament M, Mermillod P, Bruyas JF.** *In vitro* comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, v.64, p.1619-1632, 2005.
- Mozaquatro FD.** *Produção in vitro de embriões bovinos em meio suplementado com soro, BSA ou PVA e congelamento ultrarrápido.* 2004. 86f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2004.
- 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*, v.65, p.1551-1562, 2006.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB.** Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol Reprod*, v.5, p.618-22, 1994.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Nottle MB.** Improved survival of porcine hatched blastocysts cryopreserved with glycerol and sucrose. *J Reprod Dev*, v.41, p.165-170, 1995.
- Oberstein N, O'donovan MK, Bruemmer JE, Seidel Jr GE, Camevale EM, Squires EL.** Cryopreservation of equine embryos by open pulled straw, cryoloop, or conventional slow cooling methods. *Theriogenology*, v.55, p.607-613, 2001.
- Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland MP, Lonergan P.** 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.

Pereira RM, Marques CC. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank*, v. 9, p. 267-277, 2008.

Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, v.41, p.101-106, 1994.

Rall WF. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim Reprod Sci*, v.28, p.237-245, 1992.

Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, v.24, p.387-402, 1985.

Reichenbach H, Oliveira MAL, Lima PF, Filho ASS, Andrade JC. Transferência e criopreservação de embrião bovino. In: Gonçalves PB, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002. p.127-178.

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.

Széll A, Shelton JN. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J Reprod Fertil*, v.78, p.699-703, 1986.

Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N. Comparative results of *in vitro* and *in vivo* survival of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. *Theriogenology*, v.51, p.175, 1996. Resumo.

Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, v.305, p.707-709, 1983.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Grve T, Callasen H. 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, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v.65, p.236-244, 2006.

Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*, v.12, p.779-796, 2006.

Varago FC, Saliba WP, Alvim MT, Vasconcelos AB, Oliveira CH, Stahlberg R, Lagares MA. Vitrification of *in vitro* produced zebu embryos. *Anim Reprod*, v.3, p.353-358, 2006.

Visintin JA, Martins JFP, Bevilacqua EM, Mello MRB, Nicacio AC, Assumpcao MEOA. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology*, v.57, p.345-359, 2002.

Werlich DE, Barreta MH, Martins LT, Vieira AD, Moraes AN, Mezallira A. Bovine *in vitro* embryos vitrified in different cryoprotectant solutions, using or not super cooled nitrogen. *Acta Sci Vet*, v.34, p.77-82, 2006.

Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moor RM. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology*, v.11, p.560, 1974. Resumo.

Wilmot I, Rowson LE. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec*, v.92, p.686-690, 1973.

Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, v.48, p.146-156, 2004.

Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, Hachinohe Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, n.32, p.399-403, 1982.

Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, v.67, p.81-89, 2007.

Zeron Y, Pearl M, Borochoy A, Arav A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. *Cryobiology*, v.38, p.35-42, 1999.