

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Vitrificação de Embriões Equinos (*Equus caballus*) – Revisão de Literatura

Nathanael Natércio da Costa Barnabé

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Vitrificação de Embriões Equinos (*Equus caballus*) – Revisão de Literatura

Nathanael Natércio da Costa Barnabé
Graduando

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro
Orientador

Patos
Agosto de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS-PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

NATHANAEL NATÉRCIO DA COSTA BARNABÉ
Graduando

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

ENTREGUE EM/...../.....

MÉDIA: _____

BANCA EXAMINADORA:

_____ Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro Orientador	_____ Nota
_____ Prof. Dr. Jeferson Azevedo Neto Examinador I	_____ Nota
_____ Profa. Dra. Norma Lucia de Souza Araújo Examinador II	_____ Nota

À força maior que rege o universo por guiar-me (Deus);
Aos meus pais, Nivaldo Barnabé e Lúcia de Fátima por estarem incondicionalmente ao
meu lado;
Aos meus avós: Francisco Barnabé e Antônia Silva; Luís Paulino (*in memorian*) e em
especial à Francisca Saturnino (*in memorian*);
À minha irmã, Nathália Nadja e demais familiares pelo apoio;
Às almas mais puras que dividem conosco o privilégio de viver, os animais.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder-me vida e destinar-me este propósito; por renovar minhas forças nos momentos difíceis, colocar em meu caminho pessoas que contribuíram para esta conquista, fazer-me superar limitações e transpor barreiras. Minha vitória é tua vitória, Senhor.

Aos meus pais, Nivaldo Barnabé da Silva e Lúcia de Fátima da Costa Barnabé, por constituírem meu porto seguro onde sempre pude atracar e desfrutar de carinho, atenção, confiança, lealdade, conforto, cuidados... Minha dívida para com eles é eterna.

Aos meus avós Francisco Barnabé da Silva, Antônia Isabel da Silva, Luís Paulino da Costa (*in memoriam*) e, em especial, àquela com quem convivi grande parte da minha infância, que contribuiu bastante na minha formação pessoal, que pela pessoa que foi, inspira-me: Francisca Corrêa da Costa Saturnino (*in memoriam*). Aos 15 anos de idade “Vó Chica” perdeu o pai para a febre amarela. Um ano depois a morte leva sua mãe, deixando-a responsável por nove irmãos mais novos. Os criou e os fez cidadãos. Enxergo-a como legítima sertaneja, séria, destemida, forjada pelo calor, pela seca, pela morte. Um exemplo, uma heroína!

À madrinha Maria Célia da Fonseca pelo carinho e incentivo, minha irmã Nathália Nadja da Costa Barnabé, tios (as), primos (as), enfim, toda família.

À Universidade Federal de Campina Grande por cinco anos de contribuição profissional que se estenderão pelo resto dos meus dias.

Aos professores do curso de Medicina Veterinária, em especial, Dr. Pedro Isidro Nóbrega Neto, Dra. Patrícia Araújo Brandão, Dr. Davi Nogueira Maciel Alves, Dr. Gildenor Xavier de Medeiros pela humildade, pelo prazer em transmitir conhecimento formando profissionais e, sobretudo, cidadãos.

Ao professor Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro por ter se disponibilizado a orientar-me neste trabalho.

Aos colegas de turma por cinco anos de convívio e pela amizade, em especial aqueles que dividiram comigo semelhanças e diferenças, ansiedade, estudos, momentos de descontração, e a experiência de conclusão: Caio Carneiro, Pablo Sousa, Artur Ferreira, Álisson Morato, Newton Moreira, Ramon Galvão, Adailson Oliveira, Louis Tranquillin, Luiz Júnior Guimarães, Daniel Menezes, Carlos Giordânio Maia, Lamartine Brito, Cainã

Gonçalves, Múcio Ferraro, Rodrigo Alves e as meninas: Iriane Bezerra, Greyce Sousa, Ediane Freitas, Rossandra Santos, Gabryelly Xavier e Leiliane Bezerra.

Aos funcionários da UFCG, em especial, Alielson (Baixinho), Maria José, Tereza, Rômulo, Vera Lucia (Verinha), Dona Socorro e Gileno (Senhor Cuité).

À Itamária Mangueira, Francinaldo, Adriano Baltazar, Évylla Layssa, Zilva... Às pessoas que torceram por mim e contribuíram direta ou indiretamente para que meu objetivo fosse alcançado.

Meu eterno agradecimento!

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 O embrião equino e sua morfofisiologia.....	11
2.2 Avaliação de embrião à criopreservação	14
2.3 Crioprotetores	18
2.3.1 Intracelulares	19
2.3.2 Extracelulares	20
2.4 Vitrificação	21
2.4.1 Técnicas para vitrificar.....	27
2.5 Descongelamento.....	37
2.6 Desvantagens da vitrificação	38
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
4 REFERÊNCIAS	43

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Estágios de desenvolvimento embrionário.....	11
Figura 2 – Critérios de qualidade de desenvolvimento embrionário.....	15
Figura 3 – A) Embrião equino (Grau 1) no estágio de mórula. B) Embrião equino (Grau 1) no estágio de blastocisto, com massa celular interna visível.....	16
Figura 4 – A) Embrião grau 2, estágio de blastocisto inicial; presença de blastômeros extrusados (setas). B) Embrião de grau 3 no estágio de mórula, com grande percentual de blastômeros extrusados (setas).....	17
Figura 5 – A) Embrião grau 4 com 2 blastômeros e mais de 50% de fragmentos citoplasmáticos. B) Embrião grau 5.....	17
Figura 6 – Poços de soluções para vitrificação.....	27
Figura 7 – Botijão de N ₂ L para armazenamento dos embriões.....	28
Figura 8 – Palhetas francesas para vitrificação convencional.....	28
Figura 9 – Padrão de palheta aberto puxado (OPS – 8,5 cm); OPS pequeno para armazenamento em criotubos (LOPS – 6,5); OPS super fino para maior taxa de resfriamento/aquecimento (SOPS – 8,5 cm).....	30
Figura 10 – Micropipetas de vidro utilizadas para o processo de vitrificação.....	31
Figura 11 – Pipetas de desnudamento flexipet usadas na manipulação de embriões à vitrificação.....	32
Figura 12 – Tela de material metálico usada na microscopia eletrônica para vitrificação.....	32
Figura 13 – Amostra sendo diretamente coberta por nitrogênio líquido na DVC (Direct Cover Vitrification).....	33
Figura 14 – Alça de metal com um laço de nylon na extremidade (Cryoloop).....	34
Figura 15 – Espátula com extremidade plana para acondicionar o material a ser vitrificado.....	35
Figura 16 – Embrião em solução de microgota para vitrificação.....	35
Figura 17 – Superfície sólida.....	36
Figura 18 – Modelos de Cryotop.....	37

RESUMO

BARNABÉ, NATHANAEL NATÉRCIO DA COSTA. Vitriificação de Embriões Equinos (*Equus caballus*) – Revisão de Literatura. Patos, UFCG. 2014. 48p. (Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária).

Avanços nas tecnologias reprodutivas vêm permitindo o aproveitamento de material genético de animais de alto valor zootécnico ou em risco de extinção. Tudo tem sido possível graças à criobiologia que pode revolucionar a indústria equina e sua forma de comércio. A vitriificação pode ser usada em embriões equinos, porém, com suas particularidades, exigem-se protocolos específicos à espécie. O sucesso depende do tamanho do embrião, da técnica empregada e dos crioprotetores. Devido à escassez de literatura em relação à vitriificação de embriões equinos, esta revisão busca conhecimento visando futura utilização, seja na conservação genética, ou na transferência de embriões (TE), trazendo melhorias tanto na qualidade de produção quanto na preservação. O trabalho tem como objetivo reunir características do embrião equino, bem como demonstrar diversas metodologias para vitrificar, ressaltar a avaliação embrionária, a importância dos crioprotetores, o processo de desvitrificação e as desvantagens de todo o processo.

Palavras chave: Tecnologias reprodutivas, criobiologia, conservação genética.

ABSTRACT

BARNABÉ, NATHANAEL NATÉRCIO DA COSTA. Vitrification of Equine Embryos (*Equus caballus*) - Literature Review. Patos, UFCG. 2014. 48p. (Conclusion work of the Veterinary Medicine course).

Advances in reproductive technologies have allowed the use of genetic material from animals with high value livestock or endangered. Everything has been possible thanks to cryobiology that could revolutionize the equine industry and their way of trade. Vitrification can be used in equine embryos, however, with its particularities, require up to be species specific protocols. The success depends on the size of the embryo, the technique and cryoprotectants. Given the scarcity of literature regarding the vitrification of equine embryos, this review seeks knowledge aiming future use, whether in conservation genetics, or embryo transfer (ET), bringing improvements in both quality production and preservation. The work aims to gather characteristics of equine embryo, and demonstrate different methodologies for glazing, emphasize embryonic review, the importance of cryoprotectants, the process of vitrification and disadvantages of the process.

Keywords: Reproductive technologies, cryobiology, genetic conservation.

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de embriões representa uma técnica que possibilita o armazenamento dos embriões por muitos anos, mantendo sua potencialidade de desenvolvimento. Dentre dessas técnicas a vitrificação assume importância pela simplicidade de execução e baixo custo, assim como pelos bons resultados de fertilidade dos embriões vitrificados e inovulados.

Pode ser considerada uma técnica simples. A célula é submetida em grandes concentrações de crioprotetores por pouco tempo e resfriada a 2500 C°/minuto. Consiste no congelamento rápido da célula (sem presença de cristais de gelo), em baixa temperatura, dando-a aspecto de vidro.

Na Produção Animal a técnica tem como objetivo principal o Melhoramento Genético, comercialização nacional e internacional de embriões e oócitos; aplicação na produção *in vitro* de embriões; preservação de espécies em extinção; aplicação em programas de transferência embrionária.

No Brasil e no mundo é muito aplicada na Bovinocultura, por outro lado, discretamente na Equideocultura. Vitrificar embriões pode ser uma alternativa para o melhoramento genético dos equinos brasileiros e ampliação do efetivo.

Neste contexto, diante da escassez de literatura em vitrificação de embriões *Equus caballus* (equinos), esta revisão enfoca essa biotécnica visando sua aplicação imediata e com isso trazer benefícios à Equinocultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O embrião equino e sua morfofisiologia

Quando o folículo ovariano torna-se maduro, ovula. O oócito na segunda divisão meiótica (metáfase II) e com o primeiro corpo polar formado, é designado oócito secundário; em 30% dos casos, o oócito é liberado ainda imaturo, na metáfase I, completando a segunda divisão meiótica na tuba uterina. Após a ovulação, a célula circundada por uma matriz gelatinosa (células do “culumus oophorus”) é captada pela frimbria e transportada para junção ístmo-ampola, onde é fecundada. O reconhecimento da fecundação se dá pela presença de dois pró-núcleos, pelo segundo corpúsculo polar, ou pela clivagem (Figura 1) (PERES, 2002).

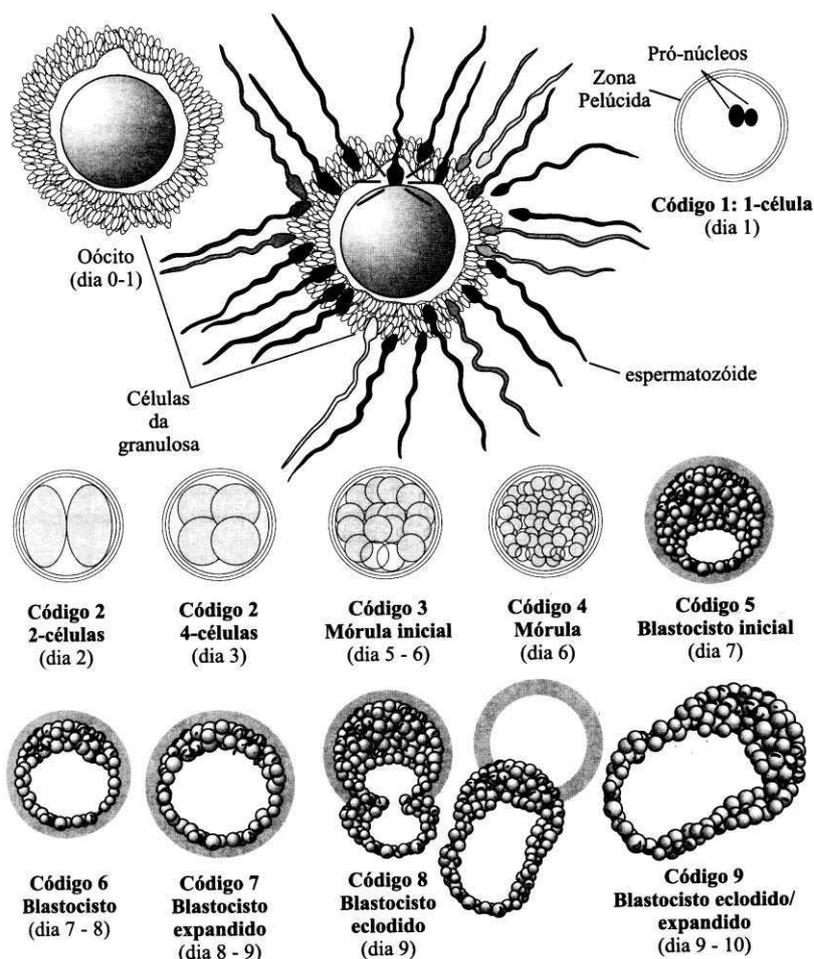


Figura 1 – Estágios de desenvolvimento embrionário. Fonte: http://eagaspar.com.br/mcguido/transf__embriao.htm.

Ahumada et al. (2006); Peres (2002) escrevem que fertilizada 12 horas após ovulação a célula perde a matriz gelatinosa e o segundo corpúsculo polar encontra-se evidente. Durante este período o *conceptus* passa por uma série de divisões celulares sem apresentar crescimento. A primeira clivagem ocorre 24 horas após a fecundação, com divisões subsequentes em intervalos de 12/24 horas. Após a primeira divisão origina-se o blastômero. O blastocisto contém um grupo de células que dará origem ao embrião denominado massa celular interna e o primeiro tecido diferenciado, o trofoblasto. O estágio embrionário é então definido pelo número de células

Diferente de oócitos recém-ovulados, embriões apresentam-se em forma elipsoidal. Quando chegam a 8 células, voltam a ser esféricos. De 8 para 16, formam-se junções entre os blastômeros, compactando. Entre 16 e 32 células, o embrião é referido como mórula inicial, ou pré-compacta, e os blastômeros dificilmente são identificados. Sucessivas divisões e formações de junções comunicantes dão origem à mórula compacta, o último estágio do embrião no oviduto, uma massa constituída por pelo menos 32 blastômeros (PERES, 2002).

Normalmente, cada estágio do desenvolvimento embrionário é encontrado dentro de uma faixa de tempo após a ovulação e não em um dia fixo; também ocorrem variações entre espécies, o que comprova diferença no tipo de migração do embrião do oviduto ao útero. Comumente em coletas através de lavagem, são encontrados embriões com variações no número de células, por exemplo, já foram coletados no segundo dia após detecção da ovulação, embriões com 4 a 8 células; no terceiro dia, variando de 8 a 16. Aos seis dias, estão na forma de mórula compacta ou blastocisto inicial. No sétimo dia, geralmente no estágio de blastocisto (PERES, 2002). McCue (2011) recomenda que profissionais sejam capazes de identificar e avaliar adequadamente os embriões, bem como o estágio de desenvolvimento, a qualidade, e tamanho. Devem ter capacidade de diferenciar embriões de ovócitos não fertilizados (UFOs).

O transporte do embrião pelo oviduto da égua dura entre 5 dias e 10 horas, e 5 dias e 22 horas, destacando que ele não aumenta significativamente de tamanho enquanto não adentram no lúmen uterino; o diâmetro do embrião, antes, durante e imediatamente o transporte pelo oviduto, foi de 157, 163 e 168 μm , respectivamente (PERES, 2002)

Segundo Peres (2002) o transporte pode ser iniciado após o sinal emitido pelo embrião equino que secreta quantidade considerável de PGE2 (prostaglandina E2). No terceiro e quarto dias, essa secreção não é detectada. No quinto dia, detecta-se na

quantidade de $5,7 \pm 1,0$ pg de PGE2 por embrião. A secreção de PGE2 também está envolvida na manutenção inicial do corpo lúteo.

A função do corpo lúteo de éguas não gestantes, não é prolongada pela administração sistêmica de PGE2, mas a infusão local acelera o transporte do embrião no oviduto. Infundindo PGE2 (0,01 mg / 24 horas), o transporte do embrião é acelerado em relação à éguas que não foram infundidas (PERES, 2002).

O mecanismo de transporte no oviduto é importante para o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida, principalmente na égua. Por exemplo, Meira et al. (2008), citam que criopreservar embriões de cavalos com diâmetros inferiores a 250 μm tem apresentado melhores resultados. Contudo, para obter embriões neste tamanho há sérias dificuldades relatadas por Peres (2002): devem ser recuperados no lúmen uterino no 6º dia pós-ovulação, quando as taxas de recuperação são as menores, quando o momento da ovulação não foi adequado, ou pela dificuldade do técnico em identificar o embrião; No dia 6, alguns embriões já são maiores que 250 μm . A menor taxa de sobrevivência após o congelamento é a de embriões maiores que 250 μm , possivelmente pela baixa permeabilidade ao crioprotetor decorrente da existência de cápsula e também pela pequena relação superfície-volume. Moya-Araujo et al. (2010) Foi destacada taxa de recuperação embrionária inferior a 45% em coletas realizadas no dia 6 após a ovulação. Indicam para a vitrificação, coletar embriões nas fases iniciais de desenvolvimento, quando apresentam diâmetro <300 μm , pois são mais resistentes ao processo de congelamento, bem como o tipo de crioprotetor e a metodologia empregada. Discordando, Garcia-Garcia et al. (2005) acredita que independente da origem e espécie, embriões no estágio de blastocisto são mais resistentes à criopreservação, quando comparados àqueles nos estádios iniciais de clivagem e mórulas. Melhores taxas de gestação são conseguidas utilizando embriões no estágio de mórula D6 a D6,5. Nesta fase, a cápsula embrionária que se forma entre a zona pelúcida e o trofoblasto não está desenvolvida completamente, ela influencia no processo de congelamento (MOYA-ARAUJO et al., 2010).

No útero, a mórula evolui em blástula, que nada mais é que uma mórula com blastocele (cavidade repleta de fluido). No início da blastocele o embrião recebe a nomenclatura de “blastocisto inicial”. Quando a blastocele se forma totalmente, encontra-se forrada por uma camada de células originadas da ectoderme denominada trofoblasto. Mais tarde, parte do trofoblasto contribuirá para a formação da placenta; uma porção de um dos pólos de células trofoblásticas se projetará para dentro da blastocele, formando

uma massa interna, o embrioblasto ou botão embrionário, precursor do embrião. Com a formação da blastocele, o embrião aumenta drasticamente de tamanho, ficando conhecido por blastocisto expandido (PERES, 2002).

Após adentrar ao útero, também ocorre a formação de uma capa acelular, localizada entre a zona pelúcida e as células do trofoblasto. A cápsula pode interferir na criopreservação do embrião. Embriões com capa espessa sofrem mais danos do que aqueles com capas finas ou sem capas quando congelados e descongelados (CARVALHO, 2013). É composta de uma matriz semelhante a colágeno + uma série de glicoproteínas. Diferente de outras espécies ela não eclode durante a expansão do blastocisto, permanecendo por dias recoberta pela zona pelúcida, mas, torna-se progressivamente mais fina até a ocorrência da eclosão. Como o blastocisto se expande, a cápsula engrossa até o 11º dia. Ela encobre o embrião até o 26º dia de gestação, quando se fragmenta (MOYA-ARAÚJO et al., 2010). De acordo com Green (2005), a estrutura sugere ser impermeável a vírus e bactérias, enquanto que a zona pelúcida é permeável à proteínas com peso molecular de 200.000, e dificulta a difusão da ferritina (PM = 450.000). Mesmo quando sua espessura é fina, ainda é bastante resistente, sendo de suma importância para o desenvolvimento embrionário. Caracteriza-se por ser um envoltório sujeito a pressões durante a fase de migração. Sua elasticidade e resistência protegem o embrião das contrações uterinas. A capa desaparece ao redor do 15º, 17º dia de gestação.

2.2 Avaliação de embrião à criopreservação

Dominar a capacidade de avaliar adequadamente os embriões é indispensável ao profissional envolvido na área de transferência embrionária (TE), o que também se aplica à vitrificação. Diferenciar embriões de ovócitos não fertilizados (UFOS) e estruturas que podem ser coletadas no procedimento de lavagem é fundamental. Esta diferenciação pode levar vários minutos. Antes de avaliados, embriões são lavados em 3 ou mais gotas de meio, ficando no fluido inicial uma quantidade significativa de debris. Para avaliação adequada, necessita-se de um bom microscópio munido de micrômetro para mensuração do diâmetro. Avaliar corretamente o embrião é importante para que se alcance sucesso na vitrificação e na TE (MCCUE, 2011).

McCue (2011) insere que para avaliá-los são levados em consideração parâmetros como: estágio de desenvolvimento, escore de qualidade (grau) e tamanho. Existem duas formas de avaliação:

1ª - Morfológica – estuda-se o zigoto em estágio de 2PN (precursores de nucléolos) levando em conta localização e número dos corpos precursores de nucléolos (CPN) nos compartimentos pronucleares masculino e feminino (Figura 2). Também foca na formação de um halo no córtex do oócito (produto da contração das organelas citoplasmáticas dos PN). O padrão de polarização CPN é considerado um bom sinal para o desenvolvimento embrionário. Presença do halo + localização dos CPN = marcador positivo de boa qualidade. Neste sistema, embriões são categorizados do padrão 0 (alta probabilidade de desenvolvimento e gravidez) ao padrão 3 (1,2,3 - poucas probabilidades de desenvolvimento e gravidez). Esta forma é útil para prever índices de prenhez, mas ineficiente para estimar sobrevivência individual, tampouco prognosticar a habilidade destes em originar crias saudáveis, pois, embriões classificados morfologicamente como de qualidade ruim podem conseguir prenhez, enquanto que os classificados como excelente podem não resultar gestação. Isto implica na necessidade de encontrar uma maneira mais precisa para conhecer a viabilidade embrionária (AHUMADA et al., 2006).

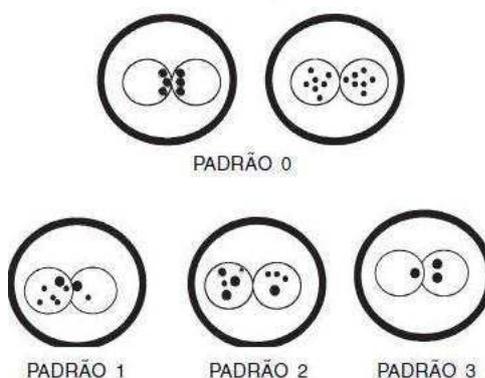


Figura 2 - Critérios de qualidade de desenvolvimento embrionário. Fonte: http://www.redlara.com/images/arq/livreto_port_01_2007.pdf

2ª - Leva em consideração fragmentos citoplasmáticos anucleados e tamanho relativo dos blastômeros. Esta forma classifica embriões em graus de I ao V. Grau I / Excelente - blastômeros de igual tamanho, sem fragmentos citoplasmáticos e com citoplasma claro e homogêneo. Sem anomalias visíveis, formato esférico, estágio de desenvolvimento adequado para idade pós-ovulação (Figura 3). Grau II / Bom -

blastômeros de igual tamanho e menos de 30% de fragmentos citoplasmáticos. Imperfeições mínimas, como alguns blastômeros extrusados, pequenas irregularidades de formato, tamanho, cor ou textura. Pouca separação entre camada trofoblásticas e a zona pelúcida ou cápsula (Figura 4A). Grau III / Ruim - blastômeros de diferentes tamanhos, zero % de fragmentos citoplasmáticos. Nível moderado de imperfeições como grande percentual de blastômeros degenerados, colapso parcial da blastocele ou afastamento moderado do trofoblasto da zona pelúcida ou cápsula (Figura 4B). Grau IV / Degenerado ou Morto - blastômeros de tamanho igual ou desigual, com 30% ou 50% de fragmentos citoplasmáticos. Problemas graves de fácil identificação como alto potencial de blastômeros extrusados, colapso total da blastocele, ruptura da zona pelúcida ou degeneração completa e morte do embrião (Figura 5A). Grau V - mais de 50% de fragmentos citoplasmáticos (AHUMADA et al., 2006; MCCUE, 2011). McCue (2011) descreve como ovócito não fertilizado (UFO) (Figura 5B).

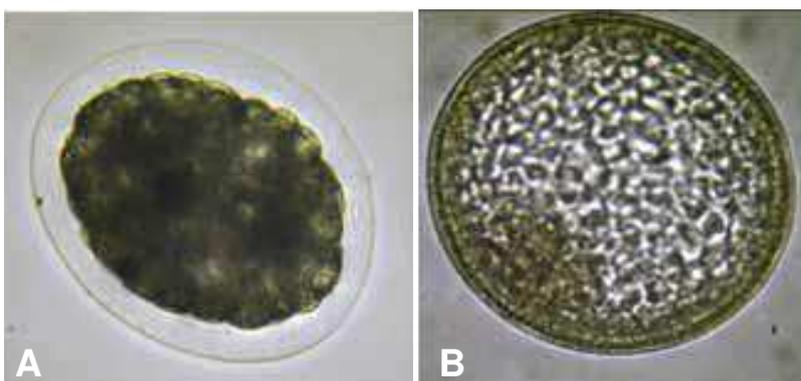


Figura 3 – A) Embrião equino (Grau 1) no estágio de mórula. B) Embrião equino (Grau 1) no estágio de blastocisto, com massa celular interna visível. Fonte: McCue (2011).

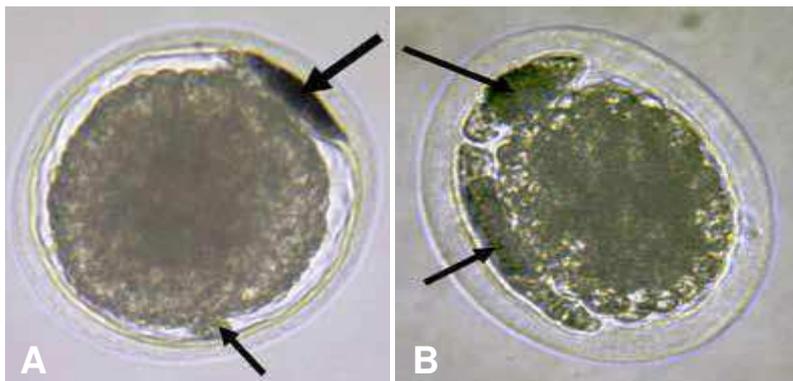


Figura 4 – A) Embrião grau 2, estágio de blastocisto inicial; presença de blastômeros extrusados (setas). B) Embrião de grau 3 no estágio de mórula, com grande percentual de blastômeros extrusados (setas). Fonte: McCue (2011).

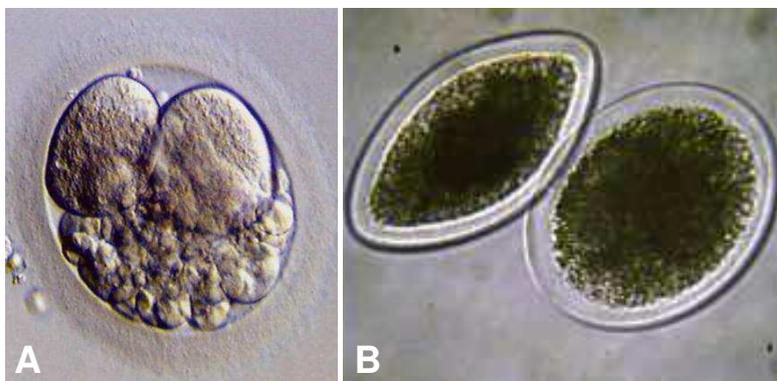


Figura 5 – A) Embrião grau 4 com 2 blastômeros e mais de 50% de fragmentos citoplasmáticos. Fonte: <http://reproducaohumana.blog.br/>. B) Embrião grau 5. Fonte: McCue (2011).

Ahumada et al. (2006) relacionaram a morfologia, a ultraestrutura, e a expressão gênica com a criotolerância, ressaltando novamente a importância dos aspectos morfológicos. A coloração dos blastômeros, a extensão da compactação, a cinética do desenvolvimento e o tempo para formação da blastocela e o diâmetro embrionário no momento da eclosão, estão diretamente ligados a qualidade embrionária. Usa-se então, uma combinação de fatores como número de células e sua localização, ocorrência de apoptose e expressão de determinados genes.

A qualidade do oócito é o principal determinante do desenvolvimento embrionário. O sistema de cultivo após a fecundação é o principal fator que influencia a qualidade do embrião, ele pode afetar o desenvolvimento e a qualidade dos blastócitos (BARBOSA et al., 2009). Alguns estudos verificam o número de blastocistos e não a qualidade. Assim sendo, métodos como contagem de células, criotolerância, e padrão de expressão gênica,

devem ser associados com mensurações de desenvolvimento embrionário para comparar diferentes meios de cultivo (MEIRA et al., 2008).

Em embriões *in vitro* qualquer problema do sistema de produção que danifique o DNA e que possa ser detectado precocemente, será de grande valia para escolha do cultivo que apresente menor risco de induzir a expressão gênica aberrante (NICACIO, 2008).

2.3 Crioprotetores

A ação crioprotetora foi descoberta acidentalmente por Polge e colaboradores em 1949, quando manipularam glicerol na tentativa de preservar espermatozoides de aves. A descoberta revolucionou métodos de criopreservação de diversas células e tecidos. Evidenciou-se a necessidade de utilizar um agente crioprotetor (ACP); células só poderiam ser expostas com sucesso ao congelamento com adição de ACP (AGUIAR et al., 2012).

Independente da técnica de criopreservação é necessário adicionar substâncias para proteção das células durante o processo de congelação e descongelação (vitricificação/desvitricificação). São adicionados visando aumento da viscosidade da solução e maior equilíbrio osmótico entre ela e o material biológico. Existem duas categorias: 1^a Intracelulares / baixo peso molecular; 2^a Extracelulares / elevado peso molecular, existindo também os de baixo peso (AGUIAR et al., 2012; AHUMADA et al., 2006; CASTRO et al., 2011).

Embora sejam indispensáveis à criopreservação segura, não garantem sobrevivência de todas as células, pois apresentam efeito tóxico que depende da concentração e do tempo de exposição (AGUIAR et al., 2012). A toxicidade varia conforme a concentração, temperatura e tempo de exposição. A tolerância a diferentes níveis de exposição a estes agentes depende da espécie em questão, e, do estágio de desenvolvimento embrionário (AGUIAR et al., 2012; CASTRO et al., 2011). Crioprotetores diferem entre si quanto à permeabilidade celular, sendo que diferentes estágios embrionários influenciarão na permeabilidade ao mesmo crioprotetor. Embriões em um mesmo estágio, mas de espécies diferentes, terão diferenças na permeabilidade a um mesmo crioprotetor (GREEN, 2005).

Possuem como características: baixo peso molecular e altas solubilidade e permeabilidade; alto peso, baixas solubilidade e permeabilidade. Promovem estabilização das proteínas intracelulares, reduzem a formação de cristais no interior das células e

diminuem o impacto causado pelos eletrólitos no meio intra e extracelular. Também Reduzem a concentração de sais dissolvidos em solução, evitando choque osmótico (AGUIAR et al., 2012; DALCIN; LUCCI, 2010).

Dalcin e Lucci (2010) sugerem quatro funções: Primeira - baixar o ponto de solidificação fornecendo maior tempo para ocorrência de desidratação celular, diminuindo a formação de gelo intracelular. Normalmente há uma queda de 2 a 3°C do ponto de solidificação, isto faz com que o congelamento ocorra a temperaturas mais baixas; Segunda – amenizar efeitos das altas concentrações moleculares evitando desidratação (moléculas tornam-se dissolvidas na mistura de água e crioprotetor “efeito tampão”); Terceira – formar vidro ao invés de cristal; Quarta – estabilizar a membrana celular durante mudança de estado físico (fortalecer membranas para que elas não se quebrem).

Em muitos casos são utilizados os dois tipos de crioprotetores associados. Os não permeáveis permanecem no meio extracelular, retirando a água livre, desidratando o espaço intracelular por efeito osmótico. Estes crioprotetores podem ser usados em combinação com os permeáveis para aumentar a concentração destes no interior das células, prevenindo cristais de gelo, diminuindo a concentração necessária do crioprotetor permeável e, sua toxicidade (AGUIAR et al., 2012; CASTRO et al., 2011; DALCIN; LUCCI, 2010). Buscando minimizar danos osmóticos e tóxicos, diferentes estratégias estão sendo utilizadas através da aplicação dos menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três crioprotetores (FIDELIS, 2013).

Para uso, crioprotetores precisam ser diluídos em solução. Nicacio (2008); Peres (2002); Sudano (2010) descrevem para diluição: solução salina tamponada (Phosphate Buffered Saline - PBS) acrescida de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) ou 10% de soro fetal bovino (SFB). Também relatam diluição em meios como TCM-199 e também recomendam o meio H-CZB. Fidelis (2013); Maciel et al. (2013) aconselham TCM-199 acrescido de diferentes concentrações de SFB e antibióticos, ou ainda TCM-199 acrescido de 20% de SFB.

2.3.1 Intracelulares

Também conhecidos por Permeáveis – atuam diminuindo a temperatura, interferindo na formação de cristais de gelo, pois criam pontes de hidrogênio com moléculas da água intracelular, retirando-a (CASTRO et al., 2011). Dalcin e Lucci (2010);

Green (2005) os ACPs intracelulares substituem parcialmente a água do interior da célula ligando-se a moléculas de hidrogênio, aumentando a viscosidade, reduzindo consequentemente o ponto de congelação. Previne o material contra altas concentrações de eletrólitos, ligando-se a eles. Para Barbosa et al. (2009); Carrilho (2013); Fidelis (2013) eles interagem com a membrana celular estabilizando-a para que não rompa no momento da congelação. Atuam como tampão hiperosmótico reduzindo o efeito da alta concentração molecular no interior das células desidratadas.

A escolha do crioprotetor mais adequado depende de vários fatores e um dos mais importantes é a toxicidade à célula envolvida. Um eficiente permeável deve possuir baixo peso molecular, habilidade para atravessar a membrana das células vivas, alta solubilidade e não ser tóxico (CARVALHO, 2011).

Aguiar et al. (2012); Barbosa et al. (2009); Castro et al. (2011) citam como exemplos: o dimetilsulfóxido - DMSO, metanol, etanol, glicerol, etilenoglicol – EG, e 1,2 propanodiol. A eficiência de cada varia de acordo com o tempo de exposição, tipo-concentração, e diferenças estruturais entre espécies.

Aguiar et al. (2012); Neves (2008) consideram como os melhores desta classe: o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido e o propanodiol, por apresentarem uma capacidade penetrante maior do que o glicerol e serem pouco tóxicos. O etilenoglicol, por exemplo, apesar de ser um fraco formador de estado vítreo, tem sido largamente utilizado em virtude de menor toxicidade e por conseguir penetrar no embrião em menor tempo do que o glicerol e o 1,2-propanodiol.

O desempenho dos intracelulares pode ser otimizado associando-os aos extracelulares. A adição de açúcares permite o uso de agentes permeáveis nas menores concentrações possíveis na solução de vitrificação, minimizando lesões tóxicas (AGUIAR et al., 2012; DALCIN; LUCCI, 2012; FIDELIS, 2013; OLIVEIRA et al., 2003).

2.3.2 Extracelulares

Aguiar et al. (2012) os descrevem como macromoléculas e açúcares, com alto peso molecular, com funções de evitar ou minimizar a formação de gelo, desidratar células e proteger membranas, tudo sem permear a célula. Também classificados como Impermeáveis - estabilizam a membrana recobrando a superfície celular, minimizando e reparando possíveis danos no processo congelamento-descongelamento. Ao invés de

entrarem na célula, recobrem a superfície celular, estabilizando a membrana, ajudando no reparo de possíveis danos.

Aguiar et al. (2012); Arrumada et al. (2006); Barbosa (2009) citam como exemplos: lactose, glicose, sacarose, polivinilpirrolidona (PVP), rafinose, manitol, sorbitol, trealose, e proteínas como gema de ovo e leite em pó, também usadas como diluidores. Os mais usados são a sacarose, glicose, lactose, trealose, polivinilpirrolidona (PVP) e manitol. O mais comum é a sacarose que exerce efeito osmótico significativo, frequentemente empregada na diluição ou reidratação de embriões após descongelamento (FIDELIS, 2013).

Meira et al. (2008); Neves (2008) dividem esta categoria em dois grupos: 1- Extracelulares de baixo peso molecular (galactose, glicose, sacarose, e trealose); 2- Extracelulares de elevado peso molecular (polivinilpirrolidona, polivinil álcool, hialuronato de sódio, e albumina sérica bovina).

Em condições normais, solução extracelular apresenta maior volume que a intracelular, por isso o congelamento extracelular ocorre primeiro. Solutos do meio externo se concentram em pequena fração de água em estado líquido, passa a exibir maior pressão osmótica e promover fluxo de água para fora da célula, desidratando-a, prevenindo-a de gelo. Este efeito destaca a importância da combinação de um crioprotetor intra e extracelular; para combater a desidratação, o agente permeável é adicionado (AGUIAR et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2003; PERES, 2002).

2.4 Vitrificação

Sola et al. (2012) insere que dentre diversas técnicas de manutenção de microrganismos, o princípio congelamento-descongelamento se manteve destacado entre os mais viáveis a preservação celular.

A criopreservação consiste em técnicas de preservação de células através do frio (MOYA-ARAUJO et al., 2010). Santin et al. (2009) complementa que através das baixas temperaturas ocorre parada da atividade celular, desde respiração, metabolismo, crescimento e multiplicação. A parte líquida do pequeno organismo torna-se sólida, enquanto que os lipídios se transformam em gordura. Após o descongelamento, com todas as características conservadas, a célula retoma seu ritmo metabólico. Peres (2002); Pyles (2003) enfatizam: ao aproximar-se de 0 °C, a atividade metabólica celular é reduzida e a

viabilidade das células se eleva. A criopreservação interrompe a atividade celular que retoma sua função após o descongelamento.

Meira et al. (2008) alertam para fatores como: velocidade do resfriamento, tamanho e estágio embrionário, crioprotetor utilizado, entre outros. Estes são determinantes para o sucesso do congelamento. Green (2005); Moya-Araujo et al. (2010) são mais detalhistas ao explicarem a efetividade da criopreservação. Para eles tudo depende de fatores como: espécie do agente, tamanho e estrutura celular, fase e taxa de desenvolvimento, temperatura de incubação, composição do meio de cultivo, pH, osmolaridade e aeração, teor de água da célula, teor lipídico, composição do meio de congelamento, taxa de resfriamento, temperatura e tempo de estocagem, taxa de aquecimento, e por último, o meio de recuperação.

Costa e Martins (2008); Moya-Araujo et al. (2010) exaltam a importância do tempo para o congelamento. Assim como o crioprotetor, o tempo é crucial para evitar formação e crescimento de cristais de gelo. Pode ser expresso como lento, moderado, rápido e ultrarrápido. Um congelamento é dito ultrarrápido quando a queda de temperatura é de 200°C/minuto, ou acima de 20.000 – 100.000 °C/minuto.

A criopreservação principalmente de embriões e oócitos tem sido motivo de interesse da criobiologia nas últimas três décadas. Curvas de resfriamento e descongelamento que permitam a sobrevivência embrionária têm sido alvos de experimentos, Aguiar et al. (2012); Carvalho (2011); Costa e Martins (2008) frisam na formação de bancos genéticos de espécies ou raças em extinção, mantendo a biodiversidade animal e avanços no melhoramento genético a partir da técnica mencionada. A necessidade de se preservar genes dentro de raças, a facilidade para o transporte e comercialização de embriões e o uso deles para transferência, têm estimulado pesquisas.

Moya-Araujo et al. (2010) ressalta vantagens desta técnica, dentre elas, na importação e exportação de embriões congelados; permite reduzir consideravelmente custos para introdução de nova genética no país, com possibilidade de preservar material genético e reduzir o número de receptoras em um programa de transferência. Dalcin e Lucci (2010); Peres (2002) falam da praticidade no transporte de embriões vitrificados entre propriedades ou para centrais de receptoras. O envio de embriões facilita o processo de reprodução em propriedades que não dispõem de receptoras aptas no momento da coleta, ou a proprietários que relutam em manter um plantel de éguas receptoras. É mais seguro transportar embriões que éguas doadoras, minimiza custos e possíveis acidentes.

Assim sendo, a criopreservação tornou-se importante para desenvolver o comércio internacional de embriões, pois essa condição facilita muito esta atividade (DALCIN; LUCCI, 2010).

As reais necessidades metabólicas ainda são desconhecidas, conseqüentemente, erra-se nos meios de cultivos, culminando em alterações nas características morfológicas e bioquímicas do embrião. Faz-se necessário frisar que protocolos de criopreservação necessitam de adequação metodológica para cada tipo de microrganismo (GREEN, 2005).

Em experimento, Okada et al. (2006) compararam em humanos taxas de gestação e sobrevivência entre embriões e oócitos congelados. Embriões descongelados e transferidos às receptoras conseguiram uma taxa de gestação equivalente a 27,3% e 76,8% de taxa de sobrevivência, enquanto que os oócitos obtiveram taxa de gestação superior (38,7%), porém, com menor sobrevivência (58,5%). Concluíram que comparados a oócitos, embriões apresentam maiores índices de sobrevivência após a vitrificação.

De acordo com Dalcin e Lucci (2010) congelar embriões da espécie equina ainda não é um procedimento rotineiro.

O aparecimento de injúrias nas células é influenciado pelo método aplicado (MEDINA, 2008). Atualmente apenas dois são considerados criopreservadores: Congelação lenta - faz-se uso de baixas concentrações de crioprotetores, tendo a temperatura gradualmente reduzida. Possui custo alto por necessitar de aparelhagem específica; Vitrificação – em contato direto com o nitrogênio líquido, a velocidade de congelamento se acentuava. Através desta constatação surgiu a metodologia da vitrificação, com altas concentrações de agentes crioprotetores tendo a temperatura rapidamente reduzida. De baixo custo, não necessita de equipamentos sofisticados. A alta concentração do agente crioprotetor aumenta a viscosidade do meio e as células apresentam algumas características semelhantes ao estado líquido e outras próprias de um sólido cristalino. Rápidas taxas de resfriamento somadas à grande viscosidade do crioprotetor vitrificam com sucesso o conteúdo (CARRILHO, 2013; CARVALHO, 2013; COSTA; MERTINS, 2008). Carrilho (2013); Carvalho (2010) alertam para a congelação lenta, onde cristais de gelo intracelulares se formam, causando danos irreversíveis à célula. Insere que a baixa concentração de crioprotetores não é eficiente para impedir a formação de cristais; outro inconveniente é a necessidade de um freezer programável de alto custo para realização da técnica. Green (2005) defende a vitrificação onde estes problemas não ocorrem. Nela, a cristalização é prevenida, resultando em efetiva preservação; há produção

de um estado vítreo onde os sistemas biológicos podem sobreviver. Meira et al. (2008); Moya-Araujo et al. (2010) consideram a vitrificação uma opção competitiva quando comparada ao congelamento lento, já que é rápida, não necessita de equipamentos caros e obtém maiores taxas de sobrevivência. Informam que para vitrificar não há necessidade de equipamentos específicos, entretanto, precisa-se de ferramentas especiais que permitam a velocidade de resfriamento elevada.

Luyet foi pioneiro neste método vitrificando sêmen de sapo na década de 40. Através de Whittingham no ano de 1971, embriões de mamíferos (camundongos) sobreviveram ao congelamento pela primeira vez. Em 1981, Luyet relatou o primeiro potro nascido de um embrião congelado (DALCIN; LUCCI, 2010). Meira e Alvarenga (1993) registraram o primeiro potro nascido no Brasil a partir de embrião vitrificado.

A vitrificação consiste em uma técnica de criopreservação rápida, fácil e barata, sendo usada com sucesso para a preservação de embriões. Tem chamado atenção porque é simples, requer pouco tempo e dispensa aparelhos caros (CARVALHO et al., 2011). A física a define como solidificação de uma solução a temperatura muito baixa, não por cristalização do gelo, mas por uma elevação extrema da viscosidade durante o esfriamento. Compreende a adição de crioprotetores em elevadas concentrações para redução da água e posterior congelamento em altas taxas de resfriamento (AHUMADA et al., 2006). Oliveira et al., 2003) definem como manutenção de tecidos em temperatura criogênica a -196°C , interrompendo todas as reações químicas, processos biológicos e físicos intra e extracelulares, mantendo por tempo indeterminado o tecido criopreservado. Sprícigo (2011) ensina que a velocidade de redução da temperatura deve ser superior à taxa de resfriamento crítico da solução para permitir a formação do estado vítreo antes da organização dos cristais de gelo.

Quando as células são submersas em nitrogênio, este se aquece e ebule intensamente, formando vapor em volta; o vapor isola e diminui a taxa de resfriamento. Para alcançar altas taxas de resfriamento o líquido é mais eficaz que o vapor, sua condutibilidade é superior. Para que a amostra esteja rodeada por líquido e não por vapor, o tamanho da amostra deve ser minimizado, reduzindo o abrigo de vapor, aumentando por consequência o resfriamento (GREEN, 2005).

A criopreservação pela vitrificação parece ser mais adequada aos embriões *in vitro* (PIV). Coleta-se o oócito que é maturado e fertilizado em laboratório com o sêmen do reprodutor desejado (FIV); por último o embrião é cultivado até o estágio propício a ser

vitricado. Este tipo de produção expõe embriões a uma grande variedade de estresse que não ocorrem na forma natural. Independente do tempo que o embrião permaneça criopreservado, o desenvolvimento *in vitro* dele não é afetado. Os Efeitos deletérios da situação de cultivo são refletidos na expressão gênica. Estes embriões podem ser percebidos pela dificuldade em criopreservá-los, dificuldade em estabelecer gestação, ou pelo desenvolvimento anormais de fetos. Para contornar o problema uma grande variedade de sistemas de cultivo vem sendo testada com métodos apropriados para produção em laboratório, tanto com propósito experimental quanto comercial (OLIVEIRA et al., 2003). Vajta et al. (1996) estudaram vitrificação de embriões produzidos em laboratório em diferentes estádios, concluindo que os índices de re-expansão de blastocistos iniciais (Bi), blastocistos (BI) e blastocistos expandidos (Bx) não diferiram, entretanto, os índices de eclosão foram superiores nos estádios adiantados. Bézard (1992) Alerta para resultados insatisfatórios da fertilização *in vitro* (FIV) na espécie equina. Relata-se o nascimento de apenas dois potros com a aplicação desta técnica e em ambos os oócitos foram maturados *in vivo*. Devido o baixo sucesso da FIV em equinos, técnicas como a fertilização *in vitro* pela injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) têm proporcionado melhores resultados. Galli et al. (2007) relataram o nascimento de cinco potros através da ICSI. Neste procedimento oócitos são obtidos, maturados, desnudos e em seguida os primeiros que apresentarem corpúsculo polar aparente são utilizados. Amostra de sêmen fresco ou descongelado é lavada e colocada em meio com polivinilpirrolidona. O espermatozoide tem sua cauda seccionada e a cabeça injetada no oócito.

Para não haver danos à célula o processo de vitrificação precisa ser acompanhado de um crioprotetor permeável, utilizado em altas concentrações. Com isso, os fluidos intra e extracelulares tornam-se mais viscosos com o resfriamento, antes da formação dos cristais de gelo, evitando danos. A probabilidade de formação de cristais de gelo pode ser diminuída (até determinado ponto) pelo aumento da viscosidade e redução do volume da solução (SANTIN et al., 2009).

Protocolos e crioprotetores usados em outras espécies foram adaptados à equina. Ulrich e Nowshari (2002) testaram o glicerol, o dimetil sulfóxido (DMSO), etilenoglicol e o 1,2-propanodiol. Uma consequência negativa disso é que às vezes o crioprotetor é muito tóxico. Para reduzir a toxicidade e não sua efetividade, as células são postas primeiro em uma solução crioprotetora de menor concentração e posteriormente na mais concentrada

(NEVES, 2008). Taxas aceitáveis de gestação foram conseguidas apenas com o glicerol e o etilenoglicol (ULRICH; NOWSHARI, 2002).

Antes de ser submetido à criopreservação, o material biológico deve ser primeiramente resfriado a 20 °C. Nesta etapa não ocorre danos desde que o material esteja diluído em meio adequado (COSTA; MARTINS, 2008; OLIVEIRA et al., 2003). De -6°C a -15°C ocorre cristalização da água e a fração descongelada do soluto aumenta, enquanto a formação de cristais intracelulares é impedida pela membrana plasmática. Dentro da célula a água permanece descongelada e quando se atinge -60 °C o microrganismo fica relativamente inerte e o material pode ser imerso em nitrogênio para armazenamento a -196°C. Temperatura abaixo de -150°C corresponde à fase de menor injúria (WATSON, 2000). O desafio das células durante todo processo não é sua habilidade em resistir à temperatura de armazenamento de -196°C, mas suportar possíveis alterações que ocorrem durante a dupla passagem pelas faixas intermediárias de temperatura (+ 19°C a + 8°C e -15°C a - 60°C), durante o congelamento e o descongelamento (COSTA; MARTINS, 2008; OLIVEIRA et al., 2003).

Diferente do meio convencional de congelação, Dobrinsky (2002) nos lembra da mistura de crioprotetores na vitrificação de embriões. Misturas como glicerol e EG, glicerol e propanodiol ou propanodiol e EG em combinação com sacarose, trealose ou galactose, mostram resultados satisfatórios. Mesmo com altas concentrações de crioprotetores, a estatística comprova que na vitrificação os efeitos cumulativos tóxicos e osmóticos não são maiores do que aqueles causados pela congelação lenta (KUWAYAMA et al., 2005).

Peres (2002); Fidelis (2013) ensinam para sucesso da vitrificação, três fatores são primordiais: viscosidade da amostra, taxas de refrigeração-aquecimento e volume da amostra. São fatores independentes, sendo que os dois primeiros estão relacionados à probabilidade de vitrificação, ou seja, quanto maior a viscosidade e a taxa de refrigeração, maior a chance de vitrificação. O volume da amostra tem relação inversa, sua diminuição aumenta a probabilidade de sucesso. Ressaltam a taxa de resfriamento ultrarrápida (centenas para dezenas de milhares de graus Celsius por minuto), obtida pelo uso do nitrogênio líquido (N₂); a viscosidade do meio a qual é definida pela concentração dos crioprotetores em uso; o volume: pequenos volumes permitem melhor transferência de calor, aumentando a taxa de resfriamento.

2.4.1 Técnicas para vitrificar

Métodos de vitrificação têm como estratégia aumentar a velocidade de condução térmica e diminuir a concentração de crioprotetores. Há duas formas de vitrificar a água dentro das células: aumentando a diferença de temperatura entre as amostras e o meio de vitrificação; a segunda é encontrar materiais com uma rápida condução de calor. Dependendo do dispositivo utilizado, da proficiência técnica e do movimento específico de imersão, a taxa de procedimentos de vitrificação pode variar (AHUMADA et al., 2006).

Não existe um “protocolo de vitrificação universal”, cada célula tem sua própria taxa de resfriamento, por exemplo, oócitos são mais sensíveis ao frio quando comparados a embriões. Relatos de gestações bem sucedidas obtidas após vitrificação estimulam mais investigação, mas faz-se necessário melhorar as taxas de sobrevivência (LIEBERMANN et al., 2002).

Eldridge-Panuska et al. (2005) e Carnevale (2006) adaptaram para a espécie equina três passos no processo: embrião permanece 5 minutos em 1,4 M de glicerol, em seguida é transferido para meio contendo 1,4 M de glicerol + 3,6 M de etilenoglicol, permanecendo por mais 5 minutos, sendo transferido para solução crioprotetora de 3,4 M glicerol + 4,6 M etilenoglicol, permanecendo menos de 1 minuto (Figura 6). Na última etapa, o embrião é envasado em palheta 0,25 ml, onde a coluna contendo o embrião deve ser separada por duas colunas de ar e duas de galactose a 0,5 M, onde posteriormente é vitrificado em nitrogênio líquido (N₂L). Assim, altas taxas de prenhez foram conseguidas por estes autores. Pós vitrificados, embriões são armazenados em botijões contendo N₂L para manutenção da baixa temperatura (Figura 7).



Figura 6 - Poços de soluções para vitrificação.
Fonte: <http://xray0.princeton.edu>.



Figura 7 - Botijão de N₂L para armazenamento dos embriões. Fonte: <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude>.

Vitrificação convencional – Green (2005) ensina: palhetas francesas de 0,25ml são preenchidas com uma coluna de 200 μ L de solução de vitrificação + 20 μ L de meio contendo embrião + 25 μ L de solução de vitrificação (Figura 8). As colunas de meio são separadas por colunas de ar com aproximadamente 8mm de comprimento. Após o preenchimento as palhetas são imediatamente seladas e imersas em N₂. De acordo com Carrilho (2013) a utilização de palhetas francesas de inseminação para abrigar os embriões acaba limitando o padrão de congelamento e aquecimento a 2000°C/minuto.



Figura 8 – Palhetas francesas para vitrificação convencional. Fonte: <http://www.cpt.com.br/>.

Vanderzwalmen et al. (2003) propuseram um modelo como forma de reduzir a quantidade de solução crioprotetora, onde corta-se ao meio (sentido longitudinal) em forma de bisel a palheta francesa de 0,25 ml (método conhecido como “hemi-palhetas”). Na superfície interna, insere-se uma gota da solução de vitrificação com o material a ser vitrificado. Depois desse procedimento, mergulha-se a hemi-palheta em N₂L, inserindo-a em palheta francesa de 0,5 ml para estocagem (LIEBERMANN, 2002). Com esta metodologia não há problemas com a identificação, por se trabalhar com uma palheta, a rotulação é facilitada (VANDERZWALMEN et al., 2003). Com a mesma função das palhetas, criotubos e macrotubos de 2 ml suportam maior quantidade de solução e maior material criopreservado (CARVALHO et al., 2011).

Para evitar rachaduras, pode-se mergulhar a palheta no nitrogênio alternadamente, colocando primeiro uma extremidade, depois sua totalidade. Essa manobra pode ser feita em até 30 segundos. Expor o material a ser vitrificado por 2 minutos ao vapor de nitrogênio antes de imergi-lo abruptamente em N₂L, previne fraturas no embrião (CARRILHO, 2013; GREEN, 2005).

Segundo Vajta e Nagy (2006), 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.

Palhetas fechadas ou CPS (Closed Pulled Straw) – A partir de uma palheta francesa, aquecendo-a e alongando-a, fabrica-se artesanalmente outra palheta. Esse procedimento tem a finalidade de facilitar a perda de calor através da redução do diâmetro. Após o posicionamento das amostras a serem vitrificadas, as extremidades da palheta são fechadas impedindo o contato com o N₂L (CARRILHO, 2013; GREEN, 2005).

Palhetas abertas ou OPS (Open Pulled Straw) – Desenvolvida originalmente para embriões bovinos e suínos, é usada quando se deseja uma taxa de resfriamento ainda mais rápida. A velocidade do resfriamento chega a 20.000°C/minuto. Vajta et al. (1996) afirmam ter provocado uma verdadeira revolução no uso da vitrificação, sendo o método bastante utilizado para embriões e ovócitos de mamíferos. Há relatos positivos com esta técnica em embriões, com boas taxas de re-expansão e eclosão.

Carrilho (2013); Green (2005); Vajta et al. (1996): Palhetas são aquecidas, consequentemente amolecidas em sua região central, esticadas manualmente até diminuir pela metade a espessura e o diâmetro interno, subsequentemente são resfriadas em ar e

cortadas em duas na extremidade estreita. Morato et al. (2008) descreve: uma extremidade é aquecida e alongada, tendo o diâmetro interno reduzido (mais ou menos = 0,8mm), proporcionando menor retenção de crioprotetor. A redução de espessura da palheta (0.07mm) proporciona menor resistência ao calor. As palhetas são fabricadas do mesmo modo das *CPS*, porém, permitem o contato direto da amostra com o N₂L (Figura 9).

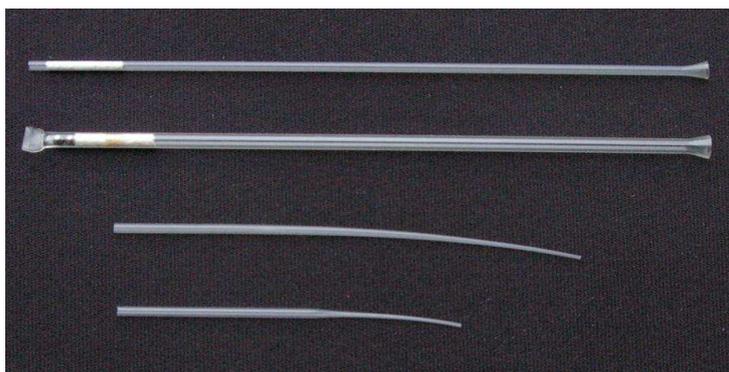


Figura 9 – Padrão de palheta aberto puxado (*OPS* – 8,5 cm); *OPS* pequeno para armazenamento em criotubos (*LOPS* – 6,5); *OPS* super fino para maior taxa de resfriamento/aquecimento (*SOPS* – 8,5 cm). Fonte: <http://www.gaborvajta.com>.

Na *OPS* o envasamento dos embriões é realizado utilizando o efeito capilar simples, igualmente na *CPS*. Cerca de 1 a 2 μ L do meio de vitrificação contendo o embrião é introduzido na extremidade estreita da palheta, sendo posteriormente submersa no N₂L, solidificando o material do interior rapidamente. A coluna líquida solidifica-se imediatamente sem que haja a dispersão da solução, o que é comum quando são utilizadas palhetas de tamanho original (GREEN, 2005; VAJTA et al., 1996).

A desvantagem do *OPS* é o risco de contaminação, o meio possuindo os embriões fica diretamente em contato com o nitrogênio líquido. Esse risco também está presente usando-se palhetas originais, pois a superfície externa submersa no meio de diluição é considerada contaminada e pode conter patógenos para a parte interna da palheta. O risco de contaminação pode ser diminuído filtrando o nitrogênio líquido em um filtro de 0,2 μ L e acondicionando o material vitrificado em palhetas de 0,5mL pré-resfriadas, fechando-se as pontas (CARRILHO, 2013; GREEN, 2005; VAJTA et al., 1996).

Micropipetas de Vidro (GMP) – Inicialmente foram produzidas com auxílio de equipamento específico a partir de capilares de vidro distendidos (Figura 10). Os capilares foram aquecidos e estirados até diminuir o diâmetro central de 1,0 para 0,3 mm,

posteriormente resfriados ao ar e cortados na extremidade mais estreita com um instrumento de diamante (CARRILHO, 2013; GREEN, 2005).



Figura 10 – Micropipetas de vidro utilizadas para o processo de vitrificação.
Fonte: <http://www.consuitec.com.br>.

Esta técnica tem o objetivo de substituir palheta de OPS. A vantagem da GMP é que ela não flutua em N₂L e tem diâmetros externo e interno menores, melhorando a condutividade de temperatura durante o resfriamento. Com a micropipeta de vidro é possível armazenar um volume 19 vezes menor (aproximadamente 0,14 mm³) que o armazenado em OPS. (GREEN, 2005).

Pipetas de desnudamento flexipet (PDF) – Método semelhante à *OPS*. São utilizadas na manipulação de embriões (Figura 11). Comparadas à *OPS*, essas palhetas possuem vantagem de serem padronizadas no tamanho e diâmetro, já que são fabricadas industrialmente (LIEBERMANN et al., 2002; MORATO et al., 2008; SANTIN et al., 2009). Os embriões são previamente tratados com a primeira solução de vitrificação (ISV - menos concentrada), depois de pré-esfriados são postos na segunda solução (IISV - mais concentrada), depois são transferidos em mínima quantidade de IISV em gotas de 20 µl. A *PDF* com 1 ou 2 µl de crioprotetor é colocada em um ângulo de 30°, permitindo que o embrião suba por capilaridade. Submerge-se então a ponta da pipeta dentro do nitrogênio líquido em ângulo de 10°, colocando dentro de uma palheta de 0,25 ml previamente identificada (VAJTA et al., 1996).



Figura 11 – Pipetas de desnudamento flexipet usadas na manipulação de embriões à vitrificação. Fonte: <http://www.origio.com>.

Grades de microscopia eletrônica – Permite contato direto da amostra com o nitrogênio líquido (Figura 12). O embrião a ser vitrificado é posto sobre grades de microscopia eletrônica, logo após é transferido para o topo da grade e com uma pipeta retira-se grande parte do meio, utiliza-se papel filtro no lado inferior da grade para retirar excesso na parte superior, deixando o embrião embebido em um pequeno volume (1 μ L). Na sequência a grade é manuseada com uma pinça de dissecação, sendo imersa diretamente no N₂L. Tudo é realizado em 30 segundos e a velocidade do congelamento é superior a 20000°C/min. (MARTINO et al., 1996). Para obter altos padrões de congelamento, são usadas grades de microscopia eletrônica feitas de cobre com 3,05mm de diâmetro. Após vitrificação, o conteúdo é armazenado dentro de criotubos em N₂L (CARRILHO, 2013; GREEN, 2005).

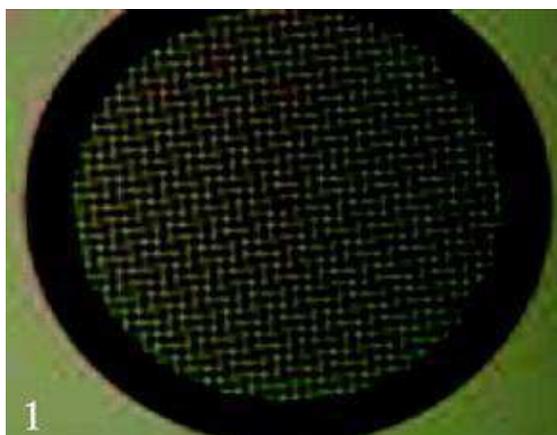


Figura 12 - Tela de material metálico usada na microscopia eletrônica para vitrificação. Fonte: <http://www.reproduction-online.org>.

Cobertura direta ou *DVC* (Direct Cover Vitrification) – Também permite contato com o N₂L (Figura 13). Uma vez que o material no criotubos é coberto por nitrogênio, obtêm-se uma redução brusca de temperatura. A imersão direta no N₂L maximiza a taxa de resfriamento, consumando rapidamente o estado vítreo. Possibilita menor quantidade de crioprotetor na solução (GREEN, 2005; SANTIN et al., 2009).



Figura 13 – Amostra sendo diretamente coberta por nitrogênio líquido na DVC (Direct Cover Vitrification). Fonte: Carvalho et al. (2011).

Cryoloop – Desenvolvida por Lane et al. (1999), consiste na utilização de um instrumento constituído por uma alça de metal presa com um laço de nylon (Figura 14). Uma espécie de laçada de nylon com 20 μ m de largura, com fio de 0,5 a 0,7mm de diâmetro (CARVALHO et al., 2011). O laço é preenchido por solução de vitrificação bastante viscosa devido à quantidade de ACP utilizada. O embrião é exposto por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida transferido à ISV, logo após é colocado na IISV. Durante esse tempo o cryoloop é imerso em IISV para formar um “filme”, desse modo, o líquido presente no laço confere uma tensão superficial que mantém o material a ser vitrificado fixo nele. Mergulha-se o material em N₂L. Vitrificada, grades padronizadas são usadas para armazenar o criotubo da amostra. Esta técnica obteve sucesso em embriões e oócitos de camundongos, humanos e ovinos (AHUMADA et al., 2012; GREEN, 2005; SANTIN et al., 2009).

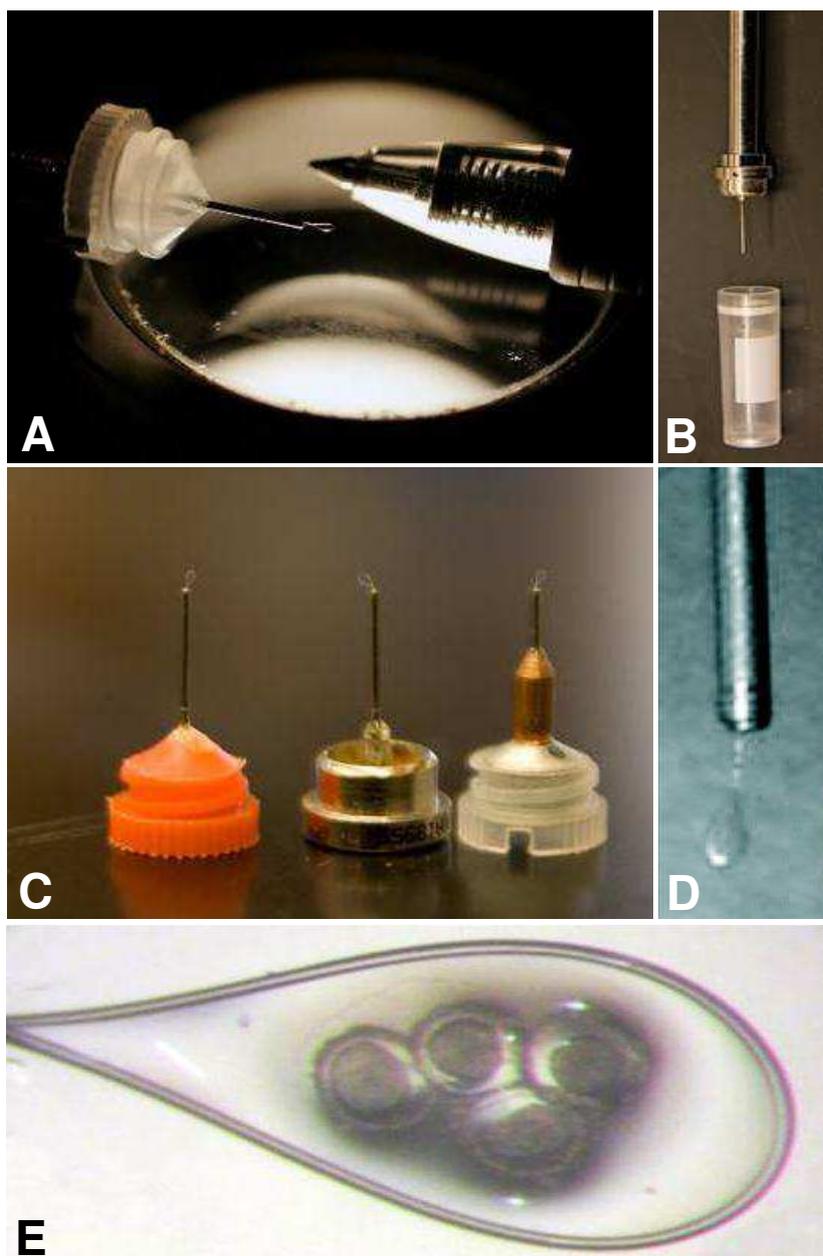


Figura 14 – Alça de metal com um laço de nylon na extremidade (Cryoloop). Fontes: A) <http://www.cleveland.com>; B/C) <http://xray0.princeton.edu>; D) <http://www.reproduction-online.org> E) <http://www.ufpi.br>.

Oberstein et al. (2001) avaliaram blastocistos equinos vitrificados em cryoloop com associação de etilenoglicol e DMSO. Comparando-os com a congelação lenta (74%), obtiveram 48% de células vivas. Este resultado evidencia diferença significativa na viabilidade celular pós vitrificação ou congelação de embriões equinos produzidos *in vivo*.

Vitrificação em espátula – Tsang e Chow desenvolveram este método em 2009. Ocorre por uma espátula preparada artesanalmente, onde uma extremidade tem forma plana para receber uma pequena gota com o material a ser vitrificado, seguidamente é

colocada em contato direto com N2L, solidificando-a (Figura 15) (CARRILHO, 2013; GREEN, 2005).

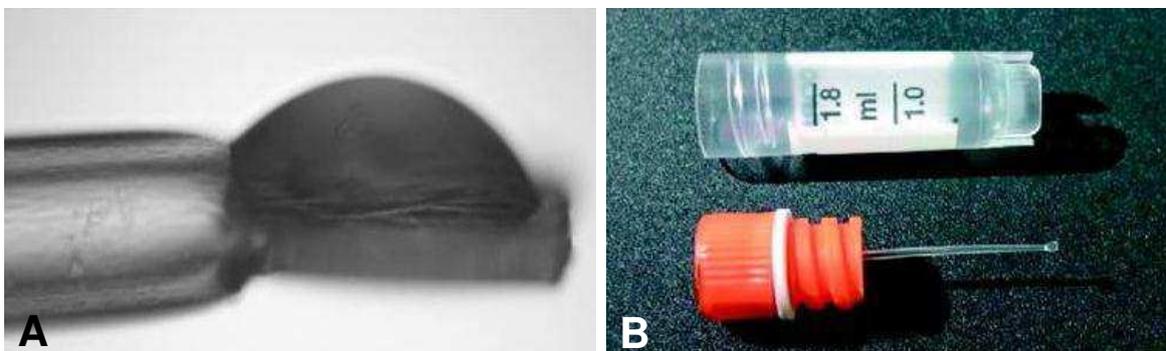


Figura 15 – Espátula com extremidade plana para acondicionar o material a ser vitrificado. Fonte: A) Carvalho et al. (2011); B) <http://www.reproduction-online.org>.

Método das Microgotas – Este método desenvolvido por Papis et al. (1999) permite vitrificar oócitos e embriões utilizando apenas uma gota de solução de vitrificação (Figura 16). Papis colocou oócitos em uma pipeta de Pasteur que se encontrava a 15 cm do N2L, o conteúdo deslizou em forma de gota caindo diretamente no nitrogênio, vitrificando-se instantaneamente. Depois de vitrificada a gota foi retirada com o auxílio de uma pinça e colocada em criotubo de 0,75 ml, previamente resfriado para armazenamento.

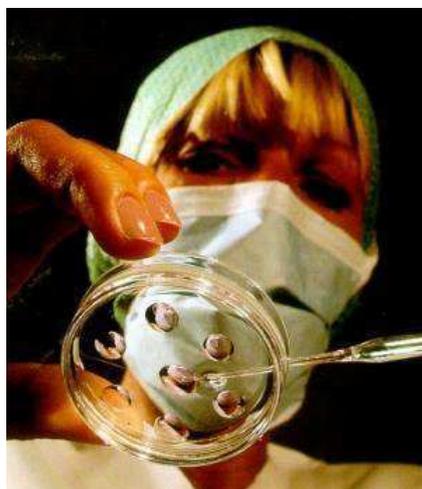


Figura 16 – Embrião em solução de microgota para vitrificação. Fonte: <http://old2014.procriar.com.br>.

Superfície sólida – A amostra é sobreposta em um cubo de metal posicionado acima do N2L (Figura 17). Por ser um bom condutor, proporciona rápido resfriamento da amostra, condição necessária para uma vitrificação eficiente. Embriões junto à solução de crioprotetores são colocados sobre superfície metálica pré-resfriada a -150°C , sendo

posteriormente mergulhado em N2L. A finalidade do método é diminuir o efeito do isolamento térmico causado pelos materiais plásticos, visto que o metal é melhor condutor de calor. Posteriormente, a amostra é armazenada em criotubos e mantida em N2 líquido (CARRILHO, 20013; GREEN, 2005; SANTIN et. al., 2009; SANTOS et al., 2010).

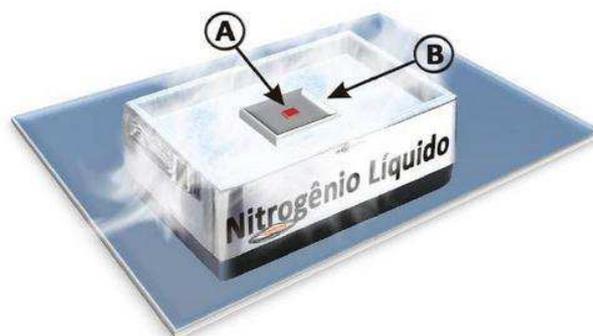


Figura 17 – Superfície sólida. Fonte: Carvalho et al. (2011).

Cryotop – Teve seu potencial demonstrado na espécie *Bos taurus* por Morato et al. (2008) e na *Equus caballus* por Tharasanit et al. (2006). Esses estudos acabaram proporcionando informações sobre sobrevivência, capacidade de desenvolvimento, assim como alterações estruturais sofridas durante o congelamento. Kuwayama et al. (2005) a descrevem como a mais recente abordagem para uso de volume mínimo. Coloca-se mínimo volume de solução com o material biológico a se vitrificar em uma haste de polipropileno (Figura 18). Testado em ovócitos humanos teve bons resultados e atualmente é a técnica mais executada nessa espécie, porém com resultados inconstantes (AHUMADA et al., 2006; KUWAYAMA et al., 2005; MORATO et al., 2008). Utiliza-se 1 μL de solução, quantidade menor do que a recomendada na *OPS* (4 μL). Embriões de no máximo 24 estruturas são retirados do cultivo e submetidos a dois banhos sequenciais em gotas de 150 μm da ISV por 9 ou 15 minutos. Posteriormente é transferido para IISV onde passa por três banhos de 20 μL cada, perfazendo 45 a 60 segundos. É então colocado nas hastes com o auxílio de uma micro pipeta de vidro com 150 μm de diâmetro. Após deposição na haste, retira-se o excesso de solução deixando uma fina camada sobre o embrião. A haste é submergida por 30 minutos no N2L (KUWAYAMA et al., 2005).

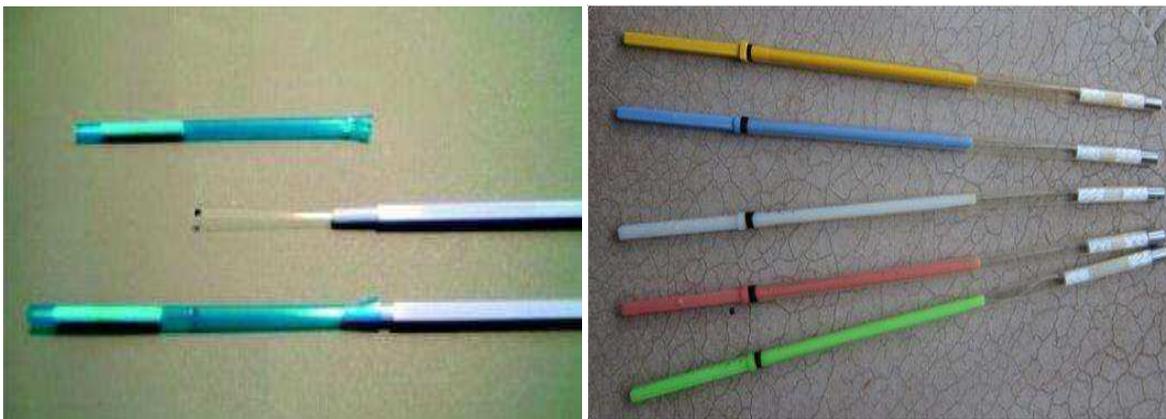


Figura 18 – Modelos de *Cryotop*. Fontes: <http://www.reproduction-online.org/>; <http://www.stanumamoi.ru/>

2.5 Descongelamento

No momento de desvitrificação/devitrificação (processo de aquecimento de embriões vitrificados) precisa-se controlar a reidratação. Pode-se utilizar crioprotetores extracelulares de baixo ou elevado peso molecular + crioprotetor intracelular. Os extracelulares são importantes por promoverem a retenção de água no exterior da célula, diminuindo o risco de lise.. Ao desvitrificar pode haver formação de cristais de gelo intracelular. Isso ocorre quando a concentração do crioprotetor permeável é insuficiente. Ela precisa ser superior a 20%, porém limitada, para diminuir danos decorrentes do efeito tóxico (JIN et al., 2008).

Existem vários métodos para desvitrificar, a eleição do método depende diretamente dos crioprotetores usados. O ideal é realizar o descongelamento sem prejuízos à célula (sem desidratação, sem lise...) e para isso utiliza-se novamente soluções crioprotetoras. A célula precisa estar mais próxima possível de sua forma natural, tanto em formato, cor e consistência.

Carrilho (2013) cita dois métodos: O primeiro - criotubo contendo o material vitrificado é exposto à temperatura ambiente por 10 segundos (s), posteriormente colocado em banho-maria a 37 °C. Ao mesmo tempo adiciona-se 1,5 ml de solução sacarose a 0,4% em Meio Essencial Mínimo (MEM+) aquecida a 37 °C. O material é mantido nesta condição por 5 minutos. Para remover a solução crioprotetora o material é transferido para uma solução MEM+ com 0,2% de sacarose, permanecendo mais cinco minutos. Após, é mantido pelo mesmo tempo em MEM+; O segundo – expõe-se o criotubo com material vitrificado à temperatura ambiente por 10s, adiciona-se 1,5 ml de meio TCM 199

suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10,3 % de sacarose a 37 °C por cinco minutos. Em seguida, lava-se três vezes durante 15 minutos (1)-5 + (2)-5 + (3)-5 = 15 em meio TCM 199 + 20% de SFB suplementado com $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$ e 0 de concentração inicial de sacarose.

Fidelis (2013) descreve outro: Retira-se a haste do N2L com o auxílio de uma pinça, mergulha-se a extremidade contendo o embrião na Solução de Desvitrificação I (SDVI = SM + 1 M de sacarose). Todas as gotas com volume de 150 μ l. Movimentos rápidos ajudam o embrião a se desprender da haste onde permanece na solução por um minuto. Depois é transferido para uma Solução de Desvitrificação II (SDVII = SM + 0,5 M de sacarose) por três minutos. Finalmente é submetido a duas lavagens em gotas de Solução de Manutenção (SM = TCM 199 + 20% SFB), permanecendo cinco minutos em cada.

2.6 Desvantagens da vitrificação

Embora seja solução para preservar raças, espécies, e uma alternativa ao melhoramento genético, à reprodução assistida, ao comércio de equinos, a vitrificação de embriões também apresenta muitas desvantagens.

Se o congelamento for realizado de maneira inadequada, ocorre o “choque térmico” que induz prejuízos à membrana, aumento de permeabilidade, perda de íons e moléculas e redução metabólica. Não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência pós-congelamento e descongelamento, mesmo usando curvas de resfriamento e aquecimento consideradas ótimas (LANDIM-ALVARENGA, 1995). Parte das pesquisas em criobiologia está direcionada a entender mecanismos de danos celulares. Existem dois tipos de danos: químico (ex.: desidratação) e físico (ex.: formação de cristais de gelo). Pode-se verificar outros danos que vitrificação causa ao embrião, como mudanças ultraestruturais, degradação de microvilos da membrana plasmática, encolhimento das mitocôndrias, acúmulo de debris e diminuição das junções celulares (WATSON, 2000). Também pode ocorrer estresse osmótico e oxidativo (GEORGE et al., 2006).

O estresse oxidativo danifica a molécula de DNA tanto nas bases e açúcares como na fita simples ou fita dupla. Dano como quebra de fita dupla pode acontecer a partir de replicação de uma quebra da fita simples (BILSLAND; DOWNS, 2005). A quebra de fita

dupla é a lesão mais deletéria ao DNA e compromete a integridade do genoma e a sobrevivência celular (JACKSON, 2002).

Pós década de 80, estudos demonstraram que crioprotetores apresentam efeito tóxico, surgindo mais um obstáculo para o sucesso da criobiologia. No processo de vitrificação, células ficam com instabilidade osmótica devido alterações das concentrações de sais pela adição de soluções. Desde então, busca-se substâncias capazes de proteger células dos efeitos deletérios das baixas temperaturas e que não sejam prejudiciais às mesmas. A concentração do crioprotetor necessária, em torno de 40% da solução, traz este efeito, aumentando o risco de injúrias. Alta concentração intracelular desidrata e eleva a concentração de íons, podendo danificar a célula (VAJTA; NAGY, 2006.). Para Landim-Alvarenga (1995), existem falhas na ação dos crioprotetores: a toxicidade limita a concentração em que este pode ser utilizado antes do resfriamento, limitando a eficácia da ação; agentes crioprotetores podem atuar na produção de crioinjúrias alterando a polaridade do meio extracelular, lesionando membranas. Dobrinsky (2002) alerta para ruptura no citoesqueleto. Em grandes concentrações promovem intoxicação do material durante manipulação em temperaturas acima de zero, podendo interferir na viabilidade pós devitrificação. Exposição, temperatura e tipo de crioprotetor, podem causar danos. Além da técnica e do material a ser criopreservado, deve-se considerar o efeito tóxico e a associação entre crioprotetores.

Independentemente da origem e espécie, embriões que não estejam no estágio de blastocisto (estágios iniciais de clivagem e mórulas) são mais frágeis à criopreservação. Isto é observado tanto na congelação lenta quanto na vitrificação. Já no estágio de blastocisto há um fator que irá interferir negativamente à criopreservação, ocorre 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. Portanto, a presença da cápsula embrionária associada à grande blastocle, dificulta a difusão dos crioprotetores e a criopreservação dos embriões equinos (GARCIA-GARCIA et al., 2005).

Khurana e Niemann (2000) afirmam que as taxas de gestação de embriões produzidos *in vitro* congelados e aquecidos, são inconsistentes e menores do que aquelas reportadas para embriões produzidos *in vivo*. Isto pode estar relacionado com algumas diferenças na morfologia, ultraestrutura e metabolismo entre embriões provenientes das duas técnicas. A qualidade dos embriões produzidos em laboratório é inferior a de

embriões naturais e que, juntamente com outros fatores, poderia ser responsável pela pobre sobrevivência destes após criopreservação. Vajta et al. (1996) correlaciona à sensibilidade destes embriões a estrutura da zona pelúcida, menor compactação das mórulas, sensibilidade ao resfriamento, aparência escura e aumento da densidade. Provavelmente estas diferenças podem ser causadas pela alta proporção lipídeos : proteínas.

No início havia possibilidade de transmissão de doenças pelo contato direto com nitrogênio líquido e a impossibilidade da transferência direta de embriões vitrificados. Com avanço nos experimentos, soluções práticas foram encontradas para resolução dos problemas (VAJTA; NAGY, 2006), por exemplo: o acondicionamento das OPS em palhetas de 0,5mL lacradas ou o uso de nitrogênio líquido filtrado e esterilizado, que eliminam a possibilidade do contato entre o espécime e possíveis contaminantes. Transferir diretamente embriões vitrificados é possível por meio da deposição direta em palhetas de 0,25 mL contendo solução de sacarose (KUWAYAMA, 2007; VAJTA et al., 1996).

Acarretam injúrias irreversíveis da refrigeração, temperaturas situadas na “zona de perigo”, abaixo da temperatura fisiológica e acima de 0 °C. Temperaturas entre 15 e -5°C causam danos de gotas lipídicas citoplasmáticas (consequência = morte do embrião) e microtúbulos (dano reversível); temperaturas entre -5 e -80°C formam cristais de gelo; entre -50 e -150°C podem ocorrer fraturas da zona pelúcida ou danos no citoplasma (VAJTA; NAGY, 2006).

No tocante conservação, células vitrificadas não podem ser armazenadas em freezers; freezers permitem variação de temperatura. A estocagem a ultra baixa temperaturas é possível com sistemas de nitrogênio líquido, pois garantem temperatura constante por longos períodos. Mesmo em sistemas de criopreservação a temperatura ultra baixa, uma variação de -196 °C a -130 °C, ou a -100 °C implica na morte dos microrganismos armazenados. Este fato deve ser levado em consideração durante a movimentação e transporte de exemplares criopreservados (VYSEKANTSEV et al., 2005).

Durante o aquecimento destes embriões (desvitrificação) pode haver formação de cristais de gelo intracelulares. Tudo 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. Crioinjúrias durante o descongelamento são resultantes, em parte, da devitrificação da solução intracelular, implicando na formação de cristais de gelo ou crescimento dos que já existiam (JIN et al., 2008). Carneiro e Cal-Vidal (2000) estudaram a estruturação dos cristais de gelo e classificaram dois mecanismos

danosos à estrutura celular. O primeiro relacionado à possibilidade de perfuração da membrana celular pelo cristal de gelo intracelular. O segundo relacionado à quebra da parede celular por cristais extracelulares.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferente de embriões bovinos e murinos, embriões *Equus caballus* ainda possuem resultados insatisfatórios relacionados à vitrificação. A morfofisiologia somada aos mecanismos para vitrificar dificultam o sucesso nesta espécie. O embrião equino possui uma espessa cápsula que dificulta a entrada e saída do crioprotetor, influenciando na tolerância ao frio. A massa celular interna possui taxa de resfriamento diferente das células do trofoblasto.

O sucesso depende de vários fatores: técnica, estágio embrionário, crioprotetores e armazenamento. Entre as autoridades no assunto, ainda não há consenso na escolha do estágio embrionário ideal para aplicação da vitrificação.

Independente da espécie em questão, vitrificar/aquecer provoca injúrias celulares, diminuindo conseqüentemente taxas de sobrevivência e prenhez, ainda inferiores às obtidas com embriões frescos. Ressalta-se que embriões produzidos *in vitro* sobrevivem menos que os *in vivo*.

A vitrificação de embriões equinos avançou discretamente; há necessidade de estudos para desenvolver protocolos específicos à espécie em questão, vislumbrando benefícios que o aperfeiçoamento desta tecnologia poderá proporcionar.

4 REFERÊNCIAS

AGUIAR T. D. F.; TEIXEIRA M. F. S.; TELES C. H. A.; MARTINS G. R.; JÚNIOR R. Q. B.; COSTA E. C.. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de microorganismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Scientiae Veterinariae Brasilica**, v.6, n.2, p.80-93, 2012.

AHUMADA A.; OLMEDO S. B.; LIEBERMANN J.; MAURI A. L.; MEDINA R.; POSADA M. N.; ROBLERO L.; ROSEMBERG E.; OLIVIERI M. T.; SEPÚLVEDA M. S.; TUCKER M.; URBINA M. T.; COCO R.; STAESSEN C.. **Manual de procedimentos – Laboratório de Reprodução Assistida**. Red. Latinoamericana De Reproducción Asistida, 2006. 133f.

BARBOSA R. T.; POLISSENE J.; GUERRA M. O.; CAMARGO L. S. A.; PETERS V. M.. Avanços tecnológicos da criopreservação de ovócitos. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.1, n.4, p.32-35, 2009.

BÉZARD, J. In vitro fertilization in the mare. **Proc Int Sci Conf Biotech Horse Reprod**, p.12, 1992

BILSLAND, E.; DOWNS, J. A. Tails of histones in DNA double-strand break repair. **Mutagenesis**, v. 20, n. 3, p. 153-163, 2005.

CARNEIRO, C. S.; CAL-VIDAL, J. Estruturas de cristais de gelo em soluções aquosas contendo solutos diversos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 2, p. 423-432, 2000.

CARNEVALE, E. M. Vitrification of equine embryos. **Vet Clin Equine**, v.22, p.831-841, 2006.

CARRILHO D.. **Comparação entre o congelamento lento e a vitrificação na criopreservação de tecido ovariano de suínos**. Dissertação (mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013. 58f.

CARVALHO A. A.. **Vitrificação de tecido ovariano caprino**. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2010. 69f.

CARVALHO A. A.. **Vitrificação de tecido ovariano caprino: Efeito de um novo dispositivo fechado e adição de catalase**. Tese (doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

CARVALHO A. A.; FAUSTINO L. R.; FIGUEIREDO J. R.; RODRIGUES A. P. R.; COSTA A. P. R.. Vitrificação: Uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Scientiae Veterinariae Brasilica**, v.5, n.3, p.236-248, 2011.

CASTRO, S. V.; CARVALHO A. A.; SILVA C. M. G.; FAUSTINO L. R.; FIGUEIREDO J. R.; RODRIGUES A. A. R.. Agentes protetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.957, 2011.

COSTA P. M.; MARTINS C. F.. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. **Univ. Ci. Saúde**, v.6, n.1, p.39-55, 2008.

DALCIN L.; LUCCI C. M.. Criopreservação de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.34, n.3, p.49-159, 2010.

DOBRYNSKY, J. R. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.

ELDRIDGE-PANUSKA, W. D.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; SEIDEL JR, G. E.; SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v.63, p.1308-1319, 2005.

FIDELIS, A. A. G. **Antioxidantes associados à pressão hidrostática sobre a viabilidade embrionária pós desvitrificação**. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013. 51 f.

GARCIA-GARCIA, M. R.; GONZALEZ-BULNES, A.; DOMINGUEZ, V.; VEIGA-LOPES, A.; COCERO, M. J. Culture of early stage ovine to blastocyst enhances survival rate after cryopreservation. **Theriogenology**, v.63, p.2233-2242, 2005.

GEORGE, F.; VRANCKEN, M.; VERHAEGHE, B.; VERHOEYE, F.; SCHNEIDER, Y. J.; MASSIP, A.; DONNAY, I. Freezing of *in vitro* produced bovine embryos in animal protein-free medium containing vegetal peptones. **Theriogenology**, v. 66, p. 1381-1390, 2006.

- GREEN R. R.. **Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos**. Dissertação (mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005. 21f.
- JACKSON, S. P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. **Carcinogenesis**, v.23, n. 5, p. 687-696, 2002.
- JIN, B.; KUSANAGI, K.; UEDA, M.; VALDEZ, J. R. D. M.; 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.
- KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived in vitro or in vivo. **Theriogenology**, v.54, p.313-326, 2000.
- LANDIM -ALVARENGA, F. C. **Avaliação dos efeitos do congelamento e descongelamento sobre a viabilidade e morfologia de embriões equinos**. 1995. 102p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 1995.
- LIEBERMANN, J., NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M. J. The potential importance of vitrification in reproductive medicine. Minireview. **Biol Reprod (in press)**. 2002.
- MACIEL K. A.; GOMES M. G. T.; DIAS F. E. F.. **Avaliação na estrutura embrionária em bovinos pós vitrificação na região norte do Tocantins**. Nono Seminário de Iniciação Científica – Universidade Federal de Tocantins, Palmas, 2013. 5f.
- MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod.**, v. 54, p. 1059-1069, 1996.
- MCCUE, P. M. Transferência de embriões em equinos – Avaliação do Embrião. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 9, n. 3, p. 80–83, 2011.
- MEDINA S. P. V.. **Criopreservação de sêmen de piratininga *Piaractus brachyomus* (Pisces, Characidae)**. Dissertação (mestrado em Ciências Marinhas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008. 76f.

MEIRA C.; IGNÁCIO F. S.; FERREIRA J. C. P.; MONTECHIESE D. F.; BICUDO S. D.. Estado da arte na reprodução assistida em equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, n.2, p. 187-198, 2008.

MEIRA, C.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. et al. Cryopreservation of equine embryos using glycerol and 1,2-propanodiol as cryoprotectants. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 15, p. 64-66, 1993.

MORATO, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO M. T.; MOGAS, T.. Cryotops versus open-pulled Straw (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**, v. 57, p. 137-41, 2008.

MOYA-ARAUJO, C. F.; ARAUJO, G.H.M.; MEIRA, C.. Avanços na criopreservação de embriões equinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.34, n.1, p.58-66, 2010.

NEVES P. R.. **Utilização de crioprotetores intra e extracelulares em embriões de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**. Tese (doutorado em concentração de Produção Animal) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008. 71f.

NICACIO A. C.. **Avaliação do desenvolvimento após a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro***. Tese (doutorado em Reprodução Animal) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. 109f.

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

OKADA, L.; AZAMBUJA, R.; PETRACCO, A.; MICHELON, J.; BADALOTTI, F.; BADALOTTI, M. Comparação da taxa de gestação entre embriões e oócitos criopreservados. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, p.25-26, 2006.

OLIVEIRA A. T. D.; FORREL F.; MEDEIROS C. M. O.; LOPES R. F. F.; RODRIGUES E. J. L.. Vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, usando etilenoglicol e sacarose. **Ars. Veterinária**, v.19, n.2, p.191-201, 2003.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine *in vitro* matured oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology**, v.51, n.1, p.173, 1999.

PERES K. R.. **Princípios da criopreservação de embriões equídeos**. Dissertação (mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002. 22f.

PYLES E. C. S.. **Criopreservação de embriões bovinos**. Tese (doutorado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003. 22f.

SANTIN T. R.; BLUME H.; MONDADORI R. G.. Criopreservação de embriões – Metodologias de vitrificação. **Vet e Zootec.**, v. 16, n. 4, p.571-574, 2009.

SANTOS, R. R.; AMORIM, C.CECCONI, S, FASSBENDER, M.; IMHOF, M.; LORNAGE, J.; PARIS, M.; SCHOENFELDT, V.; MARTINEZ-MADRID, B. Cryopreservation of ovarian tissue: na emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v.122, p.151-163, 2010.

SOLA M. C.; OLIVEIRA A. P.; FEISTEL J. C.; MINAFRA C. S.; REZENDE. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, N.14; p.1398, 2012.

SPRÍCIGO J. F. W.. **Vitrificação de ovócitos bovinos em diferentes estágios da meiose pelo método de Cryotop: Avaliação de danos morfológicos, funcionais e moleculares**. Dissertação (mestrado em Ciências Animais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011. 70f.

SUDANO N. J.. **Efeito do soro fetal bovino e do etossulfato de fenazina sobre o acúmulo lipídico, apoptose e resposta à vitrificação em embriões bovinos produzidos *in vitro***. Dissertação (mestrado na área de Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010. 107f.

THARASANIT, T.; COLLEONI, S.; LAZZARI, G.; COLENBRANDER, B.; GALLI, C.; STOUT, T. A. Effect of cumulus morphology and maturation stage on the cryopreservability of equine oocytes. **Reproduction**, v. 132, p. 759-69, 2006.

ULRICH, P.; NOWSHARI, M. A. Successful direct transfer of a frozen-thawed equine embryo. **Dtsch Tierarztl Wschr**, v.109, p.61-62, 2002.

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

VAJTA, G.; NAGY, Z. P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. **Reprod Biomed Online**, v.12, p.779-796, 2006

VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C.; STANDAERT, V.; BOLLEN, N.; VAN ROSENDAAL, E.; VANDERVOST, M.; SCHOYSMAN, R.; ZECH, N. Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. **Human reproduction**. v. 18, p. 1504-11, 2003.

VYSEKANTSEV, I. P.; GURINA, T. M.; MARTSENYUK, V. F.; PETRENKO, T. F.; KUDOKOTSEVA, E. V.; KOSHCHIY, S. V.; GROSHEVOY, M. I. Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. **Cryo Letters**. v.26, p.401-408, 2005.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.481-492, 2000

.