

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

MONOGRAFIA

Vitrificação de Embriões Bovinos

(Revisão de Literatura)

ALINE ANDRADE DE OLIVEIRA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL

CAMPUS DE PATOS – PB

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Vitrificação de Embriões Bovinos

(Revisão de Literatura)

Aline Andrade de Oliveira

Graduanda

Prof . Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro

Orientador

Patos-PB

Janeiro 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

O48v Oliveira, Aline Andrade de
Vitrificação de embriões bovinos (revisão de literatura) / Aline
Andrade de Oliveira. – Patos, 2016.
38f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) -
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e
Tecnologia Rural, 2016.

“Orientação: Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro”
Referências.

1. Vitrificação. 2. Criopreservação. 3. Embrião bovino. I. Título.

CDU 636.082

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

ALINE ANDRADE DE OLIVEIRA

Graduanda

Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para
obtenção do grau de Médica Veterinária.

APROVADO EM: / /

MÉDIA:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro	Nota
Orientador	
Prof ^a Dr ^a . Norma Lúcia de Souza Araújo	Nota
Examinador I	
Prof . Dr. Sérgio Ricardo Araújo de Melo	Nota
Examinador II	

DEDICO

A minha mãe Maria da Assunção da Silva Andrade, aos meus avós maternos José Pereira da Silva e Tereza Araújo da Silva, ao meu noivo Pedro Vinícius Victor Vitorino, aos meus avós paternos Epitácio Monteiro de Andrade (*In Memoriam*) e Estelina de Oliveira Andrade (*In Memoriam*), e ao meu irmão Anderson da Silva Andrade (*In Memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Sinto-me imensamente feliz por poder agradecer a todas estas pessoas, que em algum momento dessa jornada foram uma fonte de inspiração, força, carinho e apoio.

Em primeiro lugar agradeço a DEUS, por me colocar no meio de todas essas pessoas, permitir a realização desse sonho, por me dar forças e não me deixar desistir, mesmo diante de todas as adversidades.

A minha mãe, Assunção, que com seu exemplo me ensinou a agir com dignidade, honestidade, respeito e responsabilidade. Esta, que em diversas vezes abriu mão de suas vontades para realizar as minhas.

Aos meus avôs José Pereira e Tereza, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Estes são com certeza exemplo de luta, força, humildade e sabedoria.

Ao meu noivo Pedro, por toda paciência em me tolerar em todos esses anos, sei que não foi fácil, principalmente nas épocas de prova. Agradeço por todo amor, carinho, cumplicidade, apoio, e até mesmo as broncas .

Agradeço a Dona Socorro e Sr. Damião por todo apoio dado.

A todos os meus tios e tias, não vou citar um por um, porque são muitos, mas estes tiveram imensa importância na minha vida, sempre me aconselhando e me dando forças para que não desistisse dos meus sonhos.

Ao meu orientador Professor Carlos Peña, por todos esses anos tendo paciência em me orientar nessa caminhada e por todos os ensinamentos. Agradeço também a Professora Norma Lúcia por compartilhar do seu aprendizado e por toda amizade.

A Vera Lúcia (Verinha) por sempre estar disponível a abrir o laboratório quando foi preciso, por sua amizade e por sempre estar de braços abertos a me receber.

A todos os professores que passaram por minha vida desde a infância até hoje, sem vocês não teria chegado até aqui.

Aos funcionários da UFCG que abriram as portas do conhecimento, quando abriam cada sala de aula. Sem a disponibilidade de vocês o conhecimento não seria possível chegar até nós.

Agradeço a minha turma 2011.1 por tudo, vocês com certeza farão falta. Agradeço principalmente a Roberta e Davidianne por toda amizade, por compartilhar momentos de estudos e aprendizado.

Agradeço também a todos aqueles que não acreditaram que eu ia conseguir, pois sem dúvidas estes foram a maior fonte de inspiração para que eu pudesse mostrar que era capaz.

A todos estes o **MEU MUITO OBRIGADA**, sem vocês eu não teria conseguido, e cada um terá sempre um lugar especial em meu coração.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Conceito e objetivo da vitrificação	15
2.2 Crioprotetores	15
2.2.1 Crioprotetores Intracelulares (Penetrantes).....	17
2.2.2 Crioprotetores Extracelulares (Não Penetrantes).....	17
2.3 Métodos de vitrificação	18
2.3.1 Técnica convencional de envasamento em palhetas de 0,25ml.....	18
2.3.2 Método OPS- Open Pulled Straw	19
2.3.3 Método em micropipeta de vidro-GMP	20
2.3.4 Técnica de vitrificação em grades de microscopia em grades eletrônicas de transmissão	22
2.3.5 Técnica “Cryoloop”.....	22
2.4 Descongelção	23
2.4.1 Descongelção das palhetas francesas de 0,25 ml	24
2.4.2 Descongelção das palhetas de OPS	24
2.4.3 Descongelção da técnica de vitrificação em grades de microscopia eletronica.....	24
2.4.4 Descongelção da técnica “Cryoloop”.....	25
2.5 Danos causados pela vitrificação aos embriões	25
2.6 Fatores que podem influenciar o sucesso da vitrificação de embriões	26
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- - Classificação dos blastocistos de sete dias de desenvolvimento <i>in vitro</i> , de acordo com a <i>International Embryo Transfer Society</i>	28
Quadro 2- - Classificação dos blastocistos de sete dias de desenvolvimento <i>in vivo</i>	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Palheta de 0,25mL.....	18
Figura 2- Palhetas utilizadas no método open pulled straw (OPS)	19
Figura 3- Comparação do diâmetro entre a palheta convencional (1,7 mm) OPS (0,8 mm) e GMP (0.3 mm).....	21
Figura 4- Método “ <i>Cryoloop</i> ”.....	23
Figura 5- Imagem de embrião no estágio de blastocisto (entre 7 e 7,5 dias de desenvolvimento).....	27
Figura 7- Embriões de grau I (excelente).	28
Figura 8- Embrião grau II (bom).....	28

RESUMO

OLIVEIRA, ALINE ANDRADE. Vitriificação de Embriões Bovinos. (Revisão de Literatura). 2016. 38p. Monografia (Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) –Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Patos, 2016.

O conceito da vitriificação pode ser definido como sendo a solidificação de um líquido, que ocorre pela extrema elevação da viscosidade durante o processo de resfriamento e não pela cristalização. Dessa forma, torna-se possível resfriar os embriões, passando-os do estado líquido ao estado vítreo sem a formação de cristais de gelo intra e extracelular. O princípio básico da vitriificação é que a velocidade da criopreservação depende da massa e da área da amostra. Elas se relacionam da seguinte forma: quanto menor a massa e maior a área da solução, estrutura, ou tecido a ser criopreservado, maior deverá ser a velocidade de abaixamento da temperatura para que não ocorra formação de cristais de gelo. A única desvantagem da vitriificação comparada ao congelamento, é que na vitriificação é necessária uma maior quantidade de crioprotetores, mas para evitar esse problema pode-se fazer a associação de vários crioprotetores intracelulares e extracelulares, que é onde está uma das estratégias para o sucesso da técnica. O objetivo deste trabalho foi relatar os métodos utilizados na vitriificação de embriões bovinos.

Palavras-chaves: Vitriificação. Criopresevação. Embrião Bovino

ABSTRACT

OLIVEIRA, ALINE ANDRADE. Vitrification of Bovine Embryos. (Literature review). 2016. 38p. Monograph (Veterinary Medicine Course) Universidade Federal de Campina Grande - UFCG. Patos, 2016.

The concept of vitrification can be defined as the solidification of a liquid, which is the extreme elevation of the viscosity during the cooling process and not by crystallization. Thus, it becomes possible to cool the embryo, passing the liquid to the glassy state without the formation of ice crystals intracellular and extracellular. The basic principle is that the glazing speed of cryopreservation depends on the weight and area of the sample. They are related as follows: the lower mass and greater area of the solution structure or tissue to be cryopreserved, the higher must be the temperature lowering speed so that there is formation of ice crystals. The only disadvantage of vitrification compared to freezing, is that the vitrification greater amount of cryoprotectants is necessary, but to avoid this problem can make the association several intracellular and extracellular cryoprotectants, which is where the strategy for the success of the technique . The objective of this study was to report the methods used for vitrification of bovine embryos.

Keywords: Vitrification. Cryopreservation. Bovine embryo

1 INTRODUÇÃO

A criopreservação de embriões bovinos tem importante papel na pecuária brasileira, devido à possibilidade de formar bancos genéticos, facilitando a multiplicação e aquisição de material geneticamente superior.

O Brasil possui o segundo maior rebanho de bovino do mundo, tendo chegado 212,3 milhões de cabeça em 2014 (IBGE, 2014). Sendo que nem todo esse rebanho apresenta alta produtividade. Neste Caso, o melhoramento genético seria uma das ferramentas capaz de alavancar o potencial econômico da atividade pecuária brasileira.

Bioteχνologias da reprodução como a fertilização de embriões *in vitro* (FIV), possibilitam a multiplicação de material genético superior, mas nem sempre haverá receptoras disponíveis para inovular os embriões produzidos, sendo necessário aplicar técnicas de criopreservação, nos embriões que não poderão ser utilizados imediatamente.

A vitrificação é um excelente método de criopreservação, pois é uma técnica de baixo custo devido não ser necessária a utilização de equipamentos especializados no seu desenvolvimento e que promove uma queda rápida na temperatura, evitando que se formem cristais de gelo intracelulares, e dessa forma diminuindo os danos causados ao embrião.

A vitrificação não permite a formação de cristais de gelo, com ela ocorre a produção de um estado vítreo com os sistemas biológicos que permite as células sobreviverem (PEGG, 2007). Dessa forma a chance de sobrevivência das células aumenta, melhorando as taxas de gestação.

Além destas vantagens citadas anteriormente a vitrificação ainda permite a utilização de receptoras em cio natural, planejamento do período de nascimento dos bezerros de acordo com os interesses de manejo da propriedade, facilidade de importação e exportação, pois os custos são menores e sem os longos períodos de quarentena, diminui os riscos de transporte e segurança quanto ao aspecto higiênico sanitário.

A única desvantagem da vitrificação comparada ao congelamento, é que na vitrificação é necessária uma maior quantidade de crioprotetores, mas para evitar esse problema pode-se fazer a associação se vários crioprotetores intracelulares e extracelulares.

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi relatar os métodos utilizados na vitrificação de embriões bovinos .

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conceito e objetivo da vitrificação

A vitrificação pode ser definida como sendo a solidificação de um líquido, que ocorre pela extrema elevação da viscosidade durante o processo de resfriamento e não pela cristalização (FAHY,1986). A vitrificação quando comparada à técnica de congelamento convencional, reduz o tempo do procedimento e o custo com equipamentos para a execução da técnica (CARNEVALE et al., 2004; ELDRIDGE-PANUSKA et al., 2005; CARNEVALE, 2006).

O princípio da vitrificação consiste em aumento extremo de viscosidade devido a uma breve exposição aos crioprotetores, combinado a uma rápida taxa de resfriamento, baseado na desidratação do embrião através de sua breve exposição a soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido (VAJTA, 2000).

Hudson et al. (2006) realizaram experimento vitrificando embriões <300µm com menos de 1 hora após a colheita e embriões refrigerados a 5°C por até 19 horas, observando-se taxa de 75% (15/20) e 65% (13/20) de prenhez.

Várias metodologias de vitrificação tem sido desenvolvidas, empregando diferentes crioprotetores, velocidade de resfriamento e tipos de suporte para condicionamento, nos dias atuais a maioria das soluções de vitrificação apresentam crioprotetores diluídos em solução tamponada de fosfato, acrescida de 0,5 mM de piruvato de sódio, 3,3 mM de glicose e 20% de soro fetal bovino (WERLICH et al.,2006; GREEN, 2005).

2.2 Crioprotetores

Os agentes crioprotetores são substâncias que protegem os tecidos e células durante a vitrificação e congelamento, podendo ser classificados de duas formas: intracelulares (penetrantes) e extracelulares (não-penetrantes).

As principais características de um agente crioprotetor para ser considerado eficaz é o baixo peso molecular, a sua alta capacidade de atravessar a membrana celular e uma baixa toxicidade. Em geral, agentes com rápida capacidade de penetração são mais

favoráveis, porque o tempo de exposição ao crioprotetor antes do rápido resfriamento é curto, prevenindo assim, as injúrias osmóticas (KASAI et al, 1996).

Os efeitos da toxicidade causada pelos crioprotetores podem ser minimizados através das rápidas taxas de resfriamento ou da exposição breve aos crioprotetores (VAJTA et al.,1998). As rápidas taxas de resfriamento podem diminuir as injúrias celulares através da passagem direta pela zona perigosa de resfriamento entre +15°C e – 5°C (MARTINO et al., 1996).

Leite (2014) relatou que quanto maior a concentração dos crioprotetores, maior será a temperatura de transição vítrea, baixando assim a probabilidade de formação de cristais de gelo. A combinação de diferentes crioprotetores é frequentemente utilizada para aumentar a viscosidade e a temperatura de transição vítrea, reduzindo assim a toxicidade.

Martins et al (2005) avaliaram o efeito da vitrificação na maturação *in vitro* de ovócitos bovinos imaturos com diferentes soluções de equilíbrio (3, 20 e 40% de etilenoglicol), diferentes tempo de equilíbrio (0,5; 5 e 15 minutos) e diferentes soluções de vitrificação 40% de etilenglicol+1M de trealose e outra com 40% etilenoglicol e 1M de sacarose. Os autores verificaram que o protocolo utilizando 20% de etilenoglicol na solução de equilíbrio, com tempo de equilíbrio de 5 minutos e com solução de vitrificação contendo 40% de etilenglicol+1M de sacarose, proporcionou índices de 44,55% no estágio de Metáfase II de maturação *in vitro*.

Utilizando mistura de 20% de 1,2 propanodiol e 25% de glicerol, Massip et al.(1987) vitrificaram mórulas e blastocistos de bovinos em fase bastante precoce. O resultado de gestação atingido foi de 39,1%. Mahmoudzadeh et al. (1994) comunicaram o método de adição de soluções de vitrificação em única etapa em mórulas e blastocistos iniciais, observando que a melhor solução de vitrificação era composta de etilenoglicol a 7,15M e sacarose a 0,3M, enquanto que Ishimori et al.(1993) relataram o uso da mistura das soluções de DMSO e etilenoglicol para a vitrificação de embriões bovinos. A taxa de gestação de mórulas e blastocistos iniciais foi de 38% e para blastocistos de 40%.

2.2.1 Crioprotetores Intracelulares (Penetrantes)

Os crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula, sendo também responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento e o aquecimento (RALL et al,1984; GREEN,2005).

Holt (2000) relatou que os crioprotetores intracelulares mais utilizados foram o etilenoglicol, dimetilsufóxido, glicerol, propanodiol, butanodiol e metanol. Sendo que dos crioprotetores intracelulares o etilenoglicol é o menos tóxico, logo após está o glicerol e propilenoglicol (RUMPF et al, 2004).

Os agentes crioprotetores intracelulares diminuem as lesões químicas ou mecânicas que a congelação causa sobre a célula (KAROW, 2001). De acordo com Green (2005) o embrião quando exposto a um crioprotetor intracelular retrai devido à perda de água causada pela hiperosmolaridade inicial do meio extracelular, e também porque o embrião é mais permeável à saída de água do que à entrada do crioprotetor, o índice de entrada do crioprotetor depende do coeficiente de permeabilidade deste e da temperatura da solução, o equilíbrio é atingido quando o embrião retorna ao seu volume anterior em meio isotônico.

2.2.2 Crioprotetores Extracelulares (Não-penetrantes)

Os crioprotetores extracelulares permitem a redução da concentração dos crioprotetores intracelulares, diminuindo a toxicidade celular. Estes atuam por meio de mecanismo osmótico, promovendo a desidratação celular durante o processo e impedindo a formação de grandes cristais de gelo. Este grupo é composto por macromoléculas e açúcares, sendo os mais utilizados lactose, glicose, sacarose, plivinilpirrolidona (PVP), manitol e trealose (NIEMANN, 1991)

Segundo Rall (1987) a sacarose tem o efeito adicional de proteção celular, pois este crioprotetor extracelular causa desidratação nos embriões, reduzindo a quantidade de água no citoplasma da célula, desta forma evitando a formação de cristais de gelo intracelulares. Entretanto, Martinez et al.(2002) demonstraram que altas concentrações de sacarose

(0.5M) resultaram em baixas taxas de eclosão do embrião e redução na concentração dos crioprotetores intracelulares.

2.3 Métodos de vitrificação

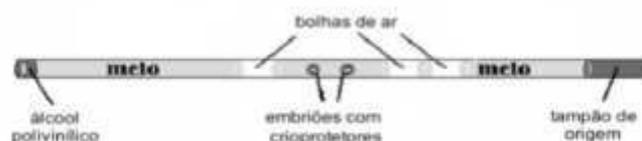
Diversas técnicas de vitrificação vem sendo desenvolvidas com o objetivo de reduzir a quantidade de crioprotetor , diminuindo assim o conteúdo a ser vitrificado, e consequentemente aumentando as taxas de resfriamento.

A criopreservação de embriões através da vitrificação consiste em expor os embriões a altas concentrações de crioprotetores, com o objetivo de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares. Sendo assim, torna-se possível resfriar os embriões, passando-os do estado líquido ao estado vítreo sem que ocorra a formação de cristais de gelo intra e extracelular (KASAI et al.,1996).

2.3.1 Método convencional de envasamento em palhetas de 0,25 mL

Esse método de vitrificação utiliza palhetas francesas de inseminação de 0,25mL para abrigar os embriões. Contudo, essas palhetas limitam o padrão máximo de congelação e aquecimento a 2000°C/min (VAJTA et al., 1998). De acordo com Martino et al.(1996), as palhetas francesas de 0,25mL são parcialmente preenchidas com uma coluna de 200µL solução de vitrificação seguida de 20µL de meio contendo os embriões e 25µL de solução de vitrificação (Figura 1). As colunas de meio são separadas por colunas de ar com aproximadamente 8mm de comprimento, assim como mostra a figura abaixo.

FIGURA 1: PALHETA DE 0,25ML.



Fonte: BATISTA,2014

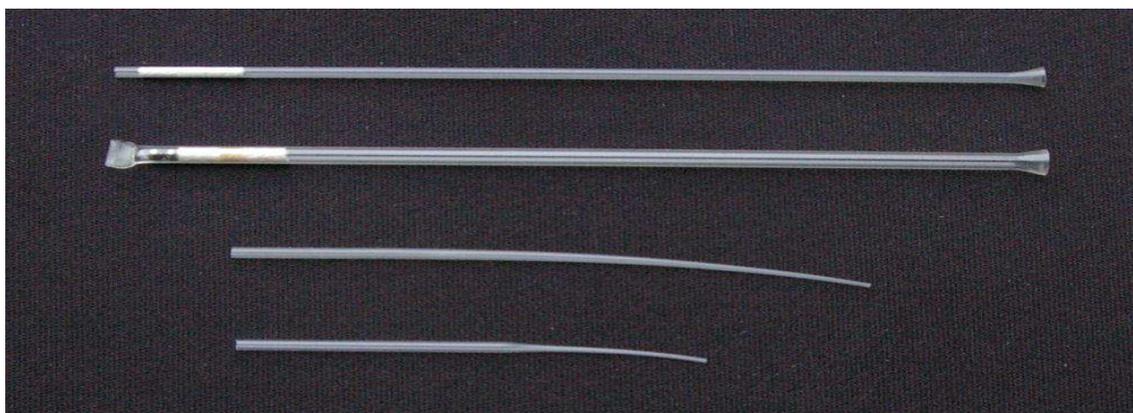
As palhetas são imersas em nitrogênio líquido, logo após serem seladas (NAITANA et al.,1997). Para prevenir rachaduras, pode-se primeiro colocar a extremidade da palheta no nitrogênio líquido e após poucos segundos a sua totalidade (PYLES, 2003).

Mezzalira et al (2002) vitrificaram vinte e sete embriões bovinos produzidos *in vivo*, após transferidos esses embriões resultaram em cinco gestações. Em outro experimento realizado por Donnay (1998) utilizando a mesma técnica e utilizando a porcentagem de reexpansão e eclosão, obtiveram taxas de 67% e 53% respectivamente, após 72 horas de cultivo de blastocistos vitrificados e desvitrificados.

2.3.2 Método OPS – Open Pulled Straw

Esta técnica denominada Open foi desenvolvida originalmente para embriões bovinos por Vajta et al.(1997). As palhetas de OPS (Figura 2) foram desenvolvidas através das palhetas francesas de 0,25mL, sendo estas amolecidas por aquecimento em sua região central e manualmente esticadas até que o diâmetro interno e a espessura da parede diminuíssem para aproximadamente metade do tamanho original.

FIGURA 2: PALHETAS UTILIZADAS NO MÉTODO OPEN PULLED STRAW-OPS.



Fonte: <http://www.gaborvajta.com/the-open-pulled-straw-system/products/>

Na extremidade estreita da palheta através do efeito capilar simples é introduzido aproximadamente de 1 a 2 μ L do meio de vitrificação contendo o embrião. A extremidade onde se encontra o embrião é imediatamente imersa no nitrogênio líquido, solidificando a coluna líquida sem que haja dispersão da solução (VAJTA et al.,1998).

A taxa de resfriamento é acima de 20.000°C/min, ou seja, é aumentada em oito vezes quando comparada as palhetas francesas de 0,25mL (VAJTA et al., 1998). A redução do volume das soluções e a diminuição da espessura da parede da palheta, permitiu que se fosse alcançada essas taxas de resfriamento.

Utilizando as palhetas de OPS é possível alcançar a vitrificação da solução utilizando uma concentração de crioprotetor menor, juntamente com o rápido resfriamento, o que irá minimizar as injúrias tóxicas e osmóticas (VAJTA et al., 1998). Segundo López-Béjar e López-Gatius (2002), as taxas de sobrevivência embrionária após a desvitrificação consegue ser melhor nos métodos de OPS do que com as palhetas de 0,25 ml.

Entretanto, o método OPS possui uma desvantagem, pois o meio contendo embriões fica em contato direto com o nitrogênio líquido, aumentando o risco de contaminação. Este risco pode ser diminuído filtrando-se o nitrogênio líquido através de um filtro de 0,2µL ou através de esterilização (VAJTA et al.,1998). Além disso, alguns autores desenvolveram técnicas para selar as palhetas de OPS, com algodão e álcool polivinílico (LÓPEZ-BÉJAR; LÓPEZ-GATIUS, 2002).

Lapatarova et al (2006) utilizando embriões bovinos produzidos *in vivo*, compararam os métodos de: vitrificação em OPS e congelamento pela técnica de transferência direta, não tendo observado diferença significativa entre as taxas de gestação obtidas. Eles encontraram taxa de prenhez, a partir de embrião grau I, vitrificado ou congelado de 55,1 % e 54,1%, respectivamente, e de embrião grau II vitrificado ou congelado de 36,4 % e 32,9%, respectivamente, mostrando que os dois métodos são viáveis e o que influenciou foi a qualidade do embrião.

Pereira (2003) utilizando a mesma técnica desenvolvida por Vajta et al. (1998) e vitrificando embriões bovinos produzidos *in vitro*, vitrificados no D7 verificou uma taxa de eclosão de 70,5% e 81,3%, respectivamente , após 48 e 72 horas de cultivo.

2.3.3 Método em micropipeta de vidro – GMP

Este método utiliza menores volumes de soluções de vitrificação, buscando um menor dano ao embrião, tendo sido desenvolvida com o objetivo de substituir a palheta de

OPS por uma palheta que não flutuasse em nitrogênio líquido e que tivesse o diâmetro interno e externo menor, melhorando as taxas de condutividade termica durante o resfriamento (CHO et al.,2002).

As micropipetas de vidro são produzidas através do esticamento de capilares de vidro,através de equipamento específico. Rodríguez; Jiménez (2010) compararam o diâmetro interno da palheta convencional, OPS e GMT (Figura 3) e constataram os seguintes valores, 1,7; 0,8 e 0,3 respectivamente.

FIGURA 3: COMPARAÇÃO DO DIÂMETRO ENTRE A PALHETA CONVENCIONAL (1,7 MM) OPS (0,8 MM) E GMP (0.3 MM).



Fonte: RODRÍGUEZ; JIMÉNEZ,2010.

Cho et al (2002) vitrificaram blastocistos bovinos em OPS e GMP, em solução contendo 16,5% de etilenoglicol e 16,5% de DMSO, em meio “holding” e observaram a taxa de reexpansão foi significativamente maior para embriões vitrificados em GMP(90,4%) do que para os embriões vitrificados em OPS (79,6%). Porém não foi observada taxa significativa na taxa de eclosão dos dois grupos.

Com um peso de 0,098g a micropipeta não flutuou quando colocada no nitrogênio líquido, o que é muito melhor para o processo de vitrificação, outra grande vantagem foi a alta velocidade de congelamento, devido a boa condutividade de temperatura e ao mínimo volume de solução crioprotetora utilizada, porém essa técnica ainda possui algumas limitações , devido a dificuldade de produção da micropipeta e da sua fragilidade, sendo

frequentemente quebrada ou rachada na extremidade mais fina, com isso favorece a perda de embriões (CHO et al, 2002).

2.3.4 Método de vitrificação em grades de microscopia eletrônica de transmissão

Martino et al. (1996), desenvolveram essa técnica com o objetivo de manter os embriões em pequeno volume de crioprotetor, utilizando como suporte físico as grades de microscopia eletrônica de transmissão, as quais são submersas em nitrogênio líquido, atingindo taxas de resfriamento superiores a 20000°C/min.

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

Park et al. (1999) seguindo esta metodologia obtiveram taxas de eclosão de 67, 8% para blastocistos bovinos expandidos e de 95% para blastocistos em eclosão, após desvitrificar e em 48 horas de cultivo.

2.3.5 Método de “Cryoloop”

Esta técnica foi desenvolvida por Lane et al. (1999) utilizando um laço de nylon de 0,05 a 0,07 mm de diâmetro e 20µm de largura (Figura 4).

FIGURA 4: MÉTODO “CRYOLOOP”



Fonte: <http://pt.slideshare.net/mobile/sasikumarsu-ndararajan/vitrification-of-blastocyst-stage-embryos>

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

De acordo com Green (2005) esta técnica tem o mesmo princípio da técnica de vitrificação em grades de microscopia eletrônica de transmissão. Porém, o cryoloop utiliza um sistema com recipiente pequeno, o que favorece a rápida troca de calor durante o resfriamento, reduzindo as crioinjúrias.

Lane et al (1999) obteve 80% na taxa de eclosão de bovinos produzidos *in vitro*. Já Begin et al (2003) vitrificando embriões caprinos produzidos *in vivo* obtiveram 100% de taxa de sobrevivência após a desvitrificação.

2.4 Descongelamento

A retirada do crioprotetor é necessária para que a reidratação do embrião e diminua a toxicidade causada a este. De acordo com Schneider e Mazur (1984), a entrada muito rápida de água na célula, pode levar a redução drástica da osmolaridade celular e consequente lise, isto pode ser evitado fazendo a diluição dos crioprotetores, que é feita adicionando-se altas concentrações de crioprotetores extracelulares como a sacarose e trealose, no meio de diluição.

2.4.1 Descongelamento das palhetas francesas de 0,25 mL

A descongelamento deste método é feita através da imersão em banho Maria a 37°C por 15 segundos, logo após são imediatamente agitadas vigorosamente para misturar as colunas de fluido entre si. O conteúdo da palheta é depositado em soluções de descongelamento em um, dois ou três passos, com diferentes concentrações sacarose. Somente com o emprego da sacarose no preparo das palhetas foi possível a transferência direta dos embriões para as receptoras na mesma palheta no qual foi vitrificado (BARIL et al., 2001; DATENNA et al.,2004).

2.4.2 Descongelamento das palhetas de OPS

O aquecimento das palhetas de OPS é realizado pela colocação da ponta mais fina diretamente na placa contendo meio a 37°C. O meio vitrificado volta ao estado líquido dentro de 1 a 2 segundos, sendo que imediatamente após, o embrião flutua no meio de diluição (VAJTA et al.,1998). Os mesmos autores após desvitrificarem os embriões observaram taxas de 70% e 94% de embriões viáveis no dia 6 e 7, respectivamente. Os meios de aquecimento contêm sacarose em diferentes concentrações, sendo a diluição realizada em um, dois ou três passos. No entanto pesquisadores como Datenna et al.(2004) testaram diluições sem sacarose e obtiveram os mesmos resultados obtidos com a diluição em meio com sacarose.

2.4.3 Descongelamento na técnica de vitrificação em grades de microscopia eletrônica

A desvitrificação e reidratação dos embriões na técnica de vitrificação em grades de microscopia eletrônica é feita em cinco etapas: as grades após saírem do nitrogênio líquido vão direto para uma placa de Petri contendo meio de cultivo com 0,5 M de sacarose, a uma temperatura de 37 ° C, após cinco segundos os embriões passam para um segundo banho também contendo 0,5 M de sacarose onde permanecem por 1 minuto, na terceira e quarta etapa as estruturas permanecem por mais 1 minuto em cada uma das soluções contendo 0,25 e 0,125 M de sacarose, respectivamente. E no quinto estágio após terem permanecido por 5 minutos em meio de cultivo eles estão aptos para serem transferidos (MARTINO et al, 1996).

2.4.4 Descongelamento da técnica “Cryoloop”

De acordo com Lane et al (1999) a descongelamento é feita colocando o “Cryoloop” na placa de petri em contato com a solução de desvitrificação e reidratação previamente aquecida, a fina película de crioprotetor se desfaz e os embriões submergem a solução.

2.5 Danos causados pela vitrificação aos embriões

Existem dois mecanismos de danos celulares: químico, como consequência da desidratação das células; e físico, causado pela formação de cristais de gelo (TAKAMATSU; RUBINSKY, 1999).

Pode-se verificar danos como: mudanças ultra-estruturais, danos aos microvilos da membrana plasmática, encolhimento das mitocôndrias, acúmulo de debris e diminuição dos contatos juncionais entre as células do trofoblasto, estes são alguns exemplos de danos (SILVA;METELO, 2005).

Durante a criopreservação, três tipos de danos podem ser distinguidos de acordo com as faixas de temperatura que o embrião atravessa: temperaturas entre +15 e -5°C, a crioinjúria afeta predominantemente as gotas lipídicas citoplasmáticas e os microtúbulos, incluindo o fusomeiótico (AMAN; PARKS, 1994; LEIBO et al., 1996). Enquanto que este último pode ser reversível, o primeiro é irreversível e, ovócitos ricos em lipídeos e embriões de algumas espécies podem não sobreviver após o processo de criopreservação (VAJTA; NAGY, 2006).

Entre -5 e -80°C, a formação de cristais de gelo extra e, predominantemente, intracelular é a principal forma de crioinjúria. Finalmente, danos de fratura na zona pelúcida ou no citoplasma ocorrem entre -50 e -150°C (RALL; MEYER, 1989). Durante o aquecimento, os mesmos tipos de injúria podem ocorrer, obviamente, na ordem inversa(VAJTA ; NAGY, 2006).

A extensão da crioinjúria depende do tamanho e tipo celular, da permeabilidade das membranas ao crioprotetor e da qualidade e sensibilidade do embrião à criopreservação. E,

todos esses fatores, podem ainda variar de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento embrionário e a origem (embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*) (MATTOS,2010).

As injúrias causadas pela vitrificação podem ser diminuídas com uma maior velocidade de congelamento, fato que foi comprovado pelos resultados obtidos na comparação direta entre as técnicas de vitrificação e congelamento lento usando embriões PIV(Produzidos *in vitro*), com taxas de sobrevivência e eclosão sempre maiores nos grupos vitrificados (NEDAMBALE et al, 2004; MUCCI et al,2006).

2.6 Fatores que podem influenciar no sucesso da vitrificação de embriões

Algumas pesquisas têm demonstrado que a criopreservação de embriões pode ser influenciada por diversos fatores como: a espécie, estágio embrionário, os crioprotetores, a composição do meio de manutenção, o tempo de equilíbrio e reidratação, as taxas de resfriamento e de aquecimento e as condições de cultivo após a criopreservação (DOBRINSKY, 1996; VAJTA et al., 1999). Embriões *in vitro*, têm se mostrado mais sensíveis a criopreservação do que os embriões *in vivo* (GEORGE et al. 2006).

Pode-se citar também como fator que influencia a sobrevivência embrionária a concentração e composição dos crioprotetores, o procedimento de diluição do crioprotetor após a descongelação e as condições de congelamento (SILVA; METELO, 2005)

Embriões ovinos e bovinos quando criopreservados em estágio de blastocisto expandido tem demonstrado maior viabilidade do que quando comparado a criopreservação no estágio de mórula, acredita-se que está relacionado a maior tolerância ao processo após a formação de blastocle (LEONI et al., 2006).

Em experimento realizado por Carnevale et al. (2004) vitrificando embriões colhidos no dia D6, D7 e D8 após a ovulação para comparar a eficiência da técnica em criopreservar embriões pequenos e grandes, além de avaliar o método de transferência direta em relação a remoção dos crioprotetores após o aquecimento seguida de transferência. A taxa de desenvolvimento embrionário no dia 16 foi de 62% e 45% para os embriões pequenos (D6) vitrificados e transferidos diretamente e para os embriões

pequenos que foi feita a remoção do crioprotetor, os embriões grandes (D7 e D8) não resultaram em gestação após a vitrificação.

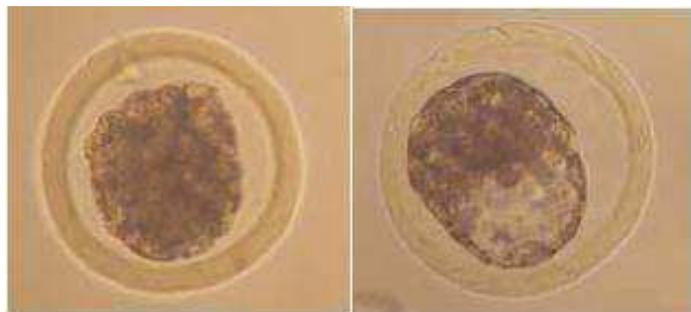
A avaliação dos embriões antes da transferência é importante para o sucesso da técnica (HOSHI, 2003). O tempo de desenvolvimento é um bom indicativo da competência de sobrevivência embrionária (THOMPSON, 1997). A qualidade do embrião é de suma importância no sucesso de qualquer técnica que esteja relacionada a embrião. Os quadros 1 e 2 mostram a classificação de blastocisto com sete dias de desenvolvimento e sua capacidade de resistir a criopreservação de acordo com a qualidade do embrião. Da mesma forma que as figuras 5,6 e 7 mostram as imagens de como esses embriões são visualizados no esteriomicroscópio.

FIGURA 5 – IMAGEM DE EMBRIÃO NO ESTÁGIO DE BLASTOCISTO (ENTRE 7 E 7,5 DIAS DE DESENVOLVIMENTO).



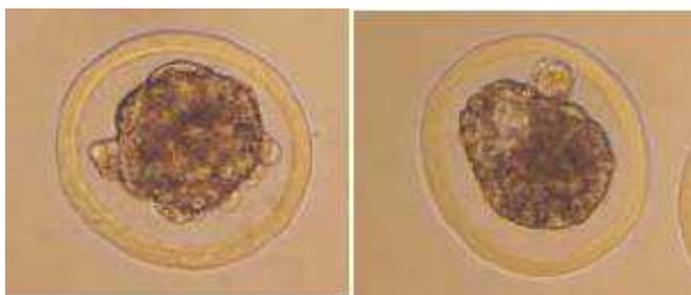
Fonte: Adaptado de VIANA, 2013.
Disponível em: <https://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/genetica/artigos/classificacao-embrioes-bovinos-produzidos-t1223/103-p0.htm>

FIGURA 7- EMBRIÕES DE GRAU I (EXCELENTE).



Fonte: Adaptado de VIANA, 2013. Disponível em:
<https://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/genetica/artigos/classificacao-embrioes-bovinos-produzidos-t1223/103-p0.htm>

FIGURA 8- EMBRIÃO GRAU II (BOM).



Fonte: Adaptado de VIANA, 2013. Disponível em:
<https://pt.engormix.com/MA-pecuaria-leite/genetica/artigos/classificacao-embrioes-bovinos-produzidos-t1223/103-p0.htm>

QUADRO 1- CLASSIFICAÇÃO DOS BLASTOCISTOS DE SETE DIAS DE DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*, DE ACORDO COM A *INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY*.

Estágio	Qualidade	Características
Blastocisto	Grau I	Excelente ou bom. Os embriões tem massa simétrica e esférica com blastômeros uniformes quanto ao tamanho, cor e densidade. O embrião é consistente com o estado de

Continua

Conclusão

		desenvolvimento esperado. As irregularidades devem ser mínimas e, no mínimo 85% das células devem estar contidas em uma massa embrionária viável e intacta (porcentagem de células embrionárias extrusas no espaço perivitelínico). A zona pelúcida deve ser macia e não possuir superfície côncava ou achatada. Que possa levar o embrião aderir na placa ou na palheta. Grau sobrevive bem após congelação/descongelação e são comumente denominados “embriões congeláveis”.
Blastocisto	Grau II	Razoável. Estes embriões apresentam irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária, no tamanho, na cor ou na densidade de células individuais. Pelo menos 50% da massa embrionária deve estar intacta. A sobrevivência desses embriões ao processo de congelamento/descongelamento é menor do que dos embriões de grau I, mas se os embriões são transferidos à fresco, em receptoras selecionadas adequadamente, apresentam taxas de gestação adequadas. Portanto, esses embriões são frequentemente chamados de "transferíveis", mas não “congeláveis”.

Fonte: Adaptado de Bó e Mapletoft, 2013 apud Leite, 2014.

QUADRO 2: CLASSIFICAÇÃO DOS BLASTOCISTOS DE SETE DIAS DE DESENVOLVIMENTO *IN VIVO*.

Estágio	Qualidade	Características
Blastocisto	Grau I	Excelente. Embrião ideal, esférico, simétrico e com células de tamanho, e coloração e

Continua

Conclusão

		textura uniformes. Ideal para ser congelado, apresenta bons resultados após descongelação.
Blastocisto	Grau II	Bom. Apresenta pequenas imperfeições como poucos blastômeros extrusos, formato irregular, alteração de cor ou presença de poucas vesículas. Podem ser congelados, porém terá menor taxa de gestação.

Fonte: Adaptado de Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, 2000.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação possibilita o armazenamento de embriões durante tempo indeterminado, permitindo que o material genético seja utilizado no momento desejado pelo produtor e da forma determinada pelo Médico Veterinário.

O congelamento ainda é a técnica mais utilizada nos dias de hoje, mas a vitrificação como método de criopreservar embriões se mostra muito eficiente, pois não forma cristais de gelo intracelulares e com isso diminui as crioinjúrias provocadas ao embrião, além de ter custo bem mais reduzido que o congelamento, já que o equipamento para desenvolvimento da técnica não necessita ser tão especializado, quanto o utilizado na técnica convencional de congelamento.

Recentemente, a vitrificação vem sendo utilizada na criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, procurando alcançar melhores resultados. O sucesso da vitrificação pode ser influenciado por diversos fatores como por exemplo, a espécie, estágio embrionário, os crioprotetores, a composição do meio de manutenção, o tempo de equilíbrio e reidratação, as taxas de resfriamento e de aquecimento e as condições de cultivo após a criopreservação .

Para melhorar os resultados obtidos de embriões que foram vitrificados é necessário que se faça uma avaliação do estágio e qualidade do embrião, como também o uso da associação de crioprotetores (intracelulares e extracelulares) corretamente, para garantir uma maior taxa de gestação após o descongelamento e inovulação destes embriões.

REFERENCIAS

AMAN, R.R.; PARKS, J.E. Effects of cooling and rewarming of the meiotic spindle and chromosomes of in vitro matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v.50, p.103-110, 1994.

BARIL, G., TRALDI, A-L., COGNIÉ, Y., LEBŒUF, B., et al. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**,v.56, p.299-305, 2001.

BATISTA, R. I. T. **Criopreservação de embriões**. 2014. Disponível em: <http://www.uece.br/lfcr/dmdocuments/criopreservao_embriao.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2015.

BEGIN, I., BHATIA, B., BALDASSARRE, H., DINNYES, A., KEEFER, C.L. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology**, v.59, p. 1839-1850, 2003.

CARNEVALE E.M. et al.. Embryo development rates after vitrification and transfer of equine embryos. *In: International Symposium on Equine Embryo Transfer*, 6, Rio de Janeiro. ISEET. p.45-46, 2004.

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

CHO, S.-K., CHO, S.-G., BAE, I.-H., PARK, C.-S., KONG, I.-K. Improvement in post-thaw viability of in vitro-produced bovine blastocysts vitrified by glass micropipette. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 73, p. 151-158, 2002.

DATTENA, M., ACCARDO, C., PILICHI, S., ISACHENKO, V., et al. Comparasion of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. **Theriogenology**, v. 62, p. 481-493, 2004.

DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL DA FMVZ-USP. **II Curso de Transferência de embriões em bovinos** (Apostila). Pirassununga, 2000.

DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cruopreservation of embryos. **Theriogenology**, V 45, n. 1, p. 17-26, 1996.

DONNAY, I., AUQUIER, Ph., KAIDI, S., CAROLAN, C., et al. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. **Anim. Reprod Sci.**, v. 52, p. 93-104, 1998.

ELDRIDGE-PANUSKA W.D. Et al. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v.63, p.1308-1319, 2005.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**. v. 23, p.1-13, 1986.

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.E. **Princípios e técnicas da vitrificação de embriões dos animais domésticos**[Monografia]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2005.

HOLT W.V., Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importace of species and individual differences . **Theriogenology**. 2000;53: p 47-58,2000.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryon transfer. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1401- 1415, 2003.

HUDSON J, MCCUE PM, CARNEVALE EM, WELCH S, SQUIRES EL. **The effects of cooling and vitrification of embryos from mares treated with equine follicle-stimulating hormone on pregnancy rates after nonsurgical transfer.** *J Equine Vet Sci*, v.26, p.51-54, 2006.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária**. 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201401_publ_completa.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2015.

ISHIMORI H., SAEKI K., INAI M., NAGAO Y., ITASAKA J., MIKI Y., et al. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. **Theriogenology**, v.40, p.427-439, 1993.

KAROW, A.M. **Cryobiology for mammalian embryologists**. Augusta, Georgia, USA, 2001 (Xytex Corporation). Disponível em: <<http://www.xytex.com/Cryobiology>> . Acesso em: 11 de setembro de 2015.

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

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

LAPARATOVA M., CECH S., HOLY., DOLEZEL R., The effect of vitrification in open pulled straws on pregnancy rates after transfer of in vivo produced bovine embryos. **Vet Med.**; v 51:p 454-460, 2006..

LEIBO, S.P.; MARTINO, A.; KOBAYASHI, S.; Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.45-53, 1996.

LEITE, A.C. **Viabilidade pós vitrificação de embriões f1 holandês x zebu produzidos in vitro e cultivados em meio contendo ácido linoléico conjugado** [Dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

LEONI, G. G., SUCCU, S., BERLINGUER, F., ROSATI, I., BEBBERE, D., BOGLIOLO, L., LEDDA, S., NAITANA, S. Delay on the in vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v.92, p.373-383, 2006.

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

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

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

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

MARTINS, R.D.; COSTA, E.P.; CHAGAS, J.S.C.; IGNACIO, F.S.; TORRES, C.A.A.; MCMANUS, C. Effects of vitrification of immature bovine oocytes on in vitro maturation. **Animal Reproduction**, v.2, n. 2, p. 128-134, 2005.

MATTOS, M.C.C. **Vitrificação e congelamento de mórulas e blastocistos produzidos in vivo em bos taurus e bos indicus** [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2010.

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

MEZZALIRA A., VIEIRA A.D., BARBIERI D.P., MACHADO M.F., THALER NETO A., BERNADI M. L., et al. **Vitrification of oocytes and in vitro produced bovine embryos exposed to cytochalasin B**. **Braz J Vet Res Anim Sci**. 2002.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, L.; ALBERIO R. H. Effect of estrus cow serum during bovine embryo culture on blastocysts development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, p. 1551-1562, 2006.

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

NEBAMDALE T.L.; DYNNIES, A.; GROENC, W; DOBRINSKY, J.R.; TIAN, X.C.; YANG, X. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM and SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 62, p. 437-439, 2004.

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

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

PARK, S.P.; KIM, E.Y.; KIM, D.Y.; PARK, N.H.; WON, Y.S.; YOON, S.H. **Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids**. Hum Repro. 1999.

PEGG, D.E. **Principles of Cryopreservation**, p.39-57, 2007.

PEREIRA D. C. **Avaliação de diferentes sistemas de cultivo na produção in vitro de embriões bovinos** [Dissertação]. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária de Brasília, Universidade de Brasília; 2003.

PYLES, E. S. C. S. **Criopreservação de Embriões Bovinos** [Monografia]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2003.

RALL, W.F.; MEYER, T.K. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. **Theriogenology**, v.31, p.683-692, 1989.

RALL, W.F.; REID, D.S.; POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos at- 196 degrees c by vitrification. **Nature**, v. 24, p. 387- 402,1984.

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

RODRÍGUEZ, P.; JIMÉNEZ, C.. **Criopreservación de embriones bovinos producidos in vitro**. 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/25401/27490>>. Acesso em: 22 dez. 2015.

RUMPF R., BRANDÃO D.O., PEREIRA D.C., CORREIA G.A. **Vitrificação de embriões produzidos *in vitro*** [Workshop]. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2004.

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

SILVA, F. M.; METELO, R. Relation between physical properties os zona pellucida and viability of bovine embryo after slow-freezing and vitrification. **Reproduction in Domestic Animals**, v40, n. 3, p.205-209, 2005.

TAKAMATSU,H.; RUBINSKY B. **Viability of deformed cells. Criobiology**, v.39, p. 243-251,1999.

THOMPSON, J. G. Comparasion between in vitro-derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p. 341-354, 1997.

WERLICH D.E., BARRETA M.H., MARTINS L.T., VIEIRA A.D., MORAIS N.A., MEZZALIRA A. **Embriões Bovino PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso do nitrogênio super-resfriado**.ActaSci. Vet 2006;34:77-82.

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

VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., et al. Open pulled straw(OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, p. 53-58, 1998.

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

VAJTA, G.; RINDOM, N. ; PEURA, T.T.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The effect of media , serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, v. 52, n.5, p. 939-948, 1999.

VAJTA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.357-364, 2000.