

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus*
CONTIDOS EM VOLUMES DIFERENTES DE 9,0 M DE ETILENO
GLICOL**

SABRINA SILVEIRA ASSAF

PORTO ALEGRE

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus*
CONTIDOS EM VOLUMES DIFERENTES DE 9,0 M DE ETILENO
GLICOL

AUTORA: SABRINA SILVEIRA ASSAF

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Reprodução Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS).

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rigo Rodrigues

PORTO ALEGRE, FEVEREIRO DE 2003

*Aos meus pais e irmãs por
constituírem o alicerce de minha
formação.*

AGRADECIMENTOS

DEUS que nos deu o dom da vida.

Ao Prof. Dr. José Luiz Rigo Rodrigues pela oportunidade de aprendizado e orientação no trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por permitir a qualificação de profissionais graduados em outros estados e acolhê-los como seus.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos para realização do mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação e funcionárias da secretaria pela disponibilidade e atenção.

À FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde) pelos animais sacrificados.

Ao Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução, pela disponibilidade dos equipamentos e material de consumo utilizados neste trabalho.

À Palmíria Silveira de Mattos pelo carinho e incentivo.

Aos amigos Marcos Eugênio Soares Duarte, Queila Kleemann, Fabíola Deboni, pela compreensão nos momentos difíceis.

Aos funcionários Leda Gomes e João Roberto pela gentileza de todos os dias.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
1 INTRODUÇÃO GERAL	9
2 ARTIGO.....	14
2.1 RESUMO.....	14
2.2 ABSTRACT.....	16
2.3 INTRODUÇÃO.....	18
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.5 RESULTADOS.....	26
2.6 DISCUSSÃO.....	27
2.7 CONCLUSÃO.....	30
3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	31
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
5 APÊNDICE.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA I: Taxas de expansão e eclosão após aquecimento e cultivo in vitro de embriões *Mus domesticus domesticus* vitrificados, envasados em fios de teflon e submetidos a dois acondicionamentos para estocagem.....**26**

TABELA II: Taxas de expansão e eclosão após aquecimento e cultivo in vitro de embriões *Mus domesticus domesticus* vitrificados, envasados em tubos eppendorf.....**27**

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina (Bovine serum albumin)
cm	centímetro (s)
°C	grau Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EG	Etileno glicol
GLY	Glicerol
GMP	Micropipeta de vidro (Glass micropipette)
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hs	horas
IETS	International Embryo Transfer Society
KSOM	meio de cultivo simplificado acrescido de K ⁺
μL	microlitro (s)
μm	micrômetro (s)
M	molar
mg	miligramas
min.	minuto
mL	mililitro (s)
mm	milímetro (s)
mOsm	miliosmol (s)
N ₂	Nitrogênio líquido
OPS	Palhetas esticadas abertas (Open pulled straw)
Pa . s	Pascal em segundo
PBSm	Solução salina fosfatada tamponada modificada

pH	potencial hidrogeniônico
PVP	Polvinil-pirolidona
SAS	Software de Análise Estatística (Statistic Analysis Software)
SC	Solução crioprotetora
SD	Solução de desidratação
SV	Solução de vitrificação
UI	Unidade Internacional
VS1	Solução de vitrificação 1
VS2	Solução de vitrificação 2
VS3	Solução de vitrificação 3

1 INTRODUÇÃO GERAL

A criopreservação de embriões tem como objetivo conservar material genético para posterior utilização, como por exemplo, preservar espécies em perigo ou em vias de extinção. É também aplicada como alternativa para o excedente de embriões coletados a partir de animais superovulados. O primeiro congelamento de embriões que resultou em nascimento, foi descrito por Whittingham et al. (1972), utilizando o *Mus domesticus domesticus* como modelo experimental. Em meados de 1973, Wilmot e Rowson obtiveram êxito congelando embriões bovinos e desde este momento até os dias atuais, um gradativo progresso tem sido alcançado, contribuindo de forma relevante na conservação de germoplasmas animais. Milhares de descendentes, especialmente de bovinos e murinos têm sido produzidos através da transferência de embriões criopreservados. De acordo com Leibo e Songsasem (2002), existem dois enfoques básicos na criopreservação, que abrangem uma variedade de tipos celulares, incluindo espermatozóides, oócitos e embriões: o *equilibrium*, no qual as células são expostas a soluções crioprotetoras em concentrações relativamente baixas ($\cong 10\%$; $\cong 1,5$ M de solução) e resfriados a intervalos de temperatura entre $0,3$ °C a 2 °C/min; e o *non-equilibrium*, no qual as células são expostas a altas concentrações de crioprotetores ($>40\%$ $\cong 6$ a 8 M de solução) e resfriadas em velocidades superiores a 500 °C/min. O método de congelamento de embriões denominado *quasi-equilibrium* descrito por Mazur (1990) e atualmente com larga utilização, baseia-se na curva padrão descrita por Willadsen et al. (1978), onde a velocidade de congelamento é semelhante ao método descrito por Whittingham et al. (1972), porém a imersão em nitrogênio líquido é feita em temperaturas mais altas (-28 °C a -35 °C).

Na crioconservação, os fatores físicos responsáveis pelas lesões celulares nas membranas e organelas, que podem causar morte celular são consequência, principalmente, do congelamento intracelular (formação de cristais intracelulares) e do denominado efeito da solução (Luyet, 1969). Os

efeitos das soluções crioprotetoras são observados em qualquer técnica de criopreservação e influenciam a vitrificação de embriões de qualquer origem, produzidos in vivo ou in vitro, de todas as espécies, e em qualquer estágio de desenvolvimento (Martínez et al., 2002).

O congelamento é um procedimento que usualmente é prejudicial à funcionalidade das membranas biológicas. As membranas são em muitas oportunidades danificadas durante as etapas do processo de resfriamento e aquecimento. De acordo com Mazur (1984), quando o aquecimento do sistema é conduzido de forma lenta, ocorre o fenômeno da recristalização, no qual os pequenos cristais de gelo formados durante a congelação rearranjam-se formando cristais maiores que podem exercer uma ação mecânica sobre as estruturas celulares, sendo a ruptura da membrana plasmática o mais frequente indicador de morte celular.

Mazur (1990), baseado em análises físico-químicas, estimou as interações das membranas com a água e os solutos. Segundo o autor, os embriões devem ser resfriados a uma taxa de desidratação suficiente para manter o potencial químico da água intracelular próximo do encontrado na água da solução extracelular parcialmente congelada (*equilibrium*: obtido a partir de um resfriamento próximo a 1,0 °C/min). Como resultado da indução da cristalização (“seeding”), o congelamento da água extracelular ocorre antes do congelamento da água intracelular, originando durante o processo de resfriamento do sistema, um aumento da concentração dos solutos nas células (Mazur, 1984). O aumento da pressão osmótica intracelular provoca a saída de água da célula, que congela no espaço extracelular. Este processo permite que até 90% do conteúdo hídrico das células embrionárias possa ser retirado com sucesso (Wolfe e Bryant, 1999).

A técnica de vitrificação de embriões, introduzida por Rall e Fahy (1985a), é uma das alternativas à criopreservação convencional, que continua proporcionando inovações por ser simples, rápida, econômica, e aplicável a todas as espécies. Vitrificação é o fenômeno que envolve um complexo de fatores que atuam de forma interdependente nos quais a

temperatura, natureza e concentração do soluto e a velocidade de resfriamento contribuem para que o líquido solidifique-se no estado vítreo ou amorfo (Luyet, 1969). A vitrificação elimina o congelamento intracelular da água, pois o rápido resfriamento do líquido impede a cristalização resultando em um estado amorfo, mas o que definitivamente caracteriza a vitrificação, é a viscosidade da solução (acima de $\sim 10^{14}$ Pa.s) que é atingida através de baixas temperaturas. Uma vez atingido o estado vítreo, a desidratação celular é limitada. Este fenômeno ocorre porque a solução ao vitrificar, limita o aumento da concentração da parte da solução que ainda não vitrificou, pois o estado vítreo e a alta viscosidade dos fluídos reduzem a difusão dos solutos de dentro da célula (Wolfe e Bryant, 1999).

As soluções crioprotetoras inicialmente utilizadas na vitrificação exibiam altas concentrações de crioprotetores de baixo peso molecular e eram facilmente permeáveis ao citoplasma das células embrionárias. Essas soluções denominadas pelos autores VS1 eram basicamente compostas de crioprotetores permeáveis (20,5% dimetilsulfóxido, 15,5% acetamida, 10% propileno glicol) e crioprotetores não-permeáveis (6% polietileno glicol), que possibilitaram a sobrevivência de embriões *Mus domesticus domesticus* (Rall e Fahy, 1985b). Posteriormente, surgiram soluções que não requeriam acetamida e que apresentavam menor toxicidade química, apesar de ainda incluírem crioprotetores permeáveis em sua composição. Foram designadas como VS2 e VS3 e tinham como base os crioprotetores propileno glicol ou glicerol, em combinação com o polietileno glicol sendo utilizados não apenas com embriões de camundongos, mas também de bovinos e de coelhos (Rall, 1987).

Com o intuito de melhorar a capacidade de vitrificação das soluções, Kasai et al. (1992a), desenvolveram uma solução que diferenciava-se das anteriores, pois constituía-se da mistura de 40% etileno glicol e 18% ficoll em uma solução salina (PBS modificado) com baixas concentrações de macromoléculas (0,3 M sacarose). Esta solução foi utilizada para criopreservação de mórulas e blastocistos iniciais bovinos e murinos.

O processo osmótico causado pela saturação dos blastômeros com aumento da concentração de crioprotetores permeáveis durante os procedimentos de vitrificação, foi reportado como importante causa de morte celular em blastocistos bovinos (Kuwayama et al., 1994). Acredita-se que a ação de proteção celular proporcionada pelos crioprotetores não-permeáveis, ocorre através da estabilização das membranas celulares. Existem dois enfoques distintos quanto à ação dos crioprotetores na vitrificação de embriões mamíferos: primeiro, quando somente crioprotetores permeáveis são usados, com o principal objetivo de retirar a água intracelular e impedir a formação de cristais de gelo. Segundo, quando a solução de vitrificação contém substâncias não-permeáveis, que cristalizam da mesma maneira que os crioprotetores permeáveis. Por este motivo, os cristais de gelo de dimensões reduzidas, que são formados quando os embriões são imersos em nitrogênio líquido, não comprometem as estruturas celulares (Isachenko et al., 1997).

No desenvolvimento da crioconservação as soluções protetoras pouco modificaram-se, atualmente a ênfase dos experimentos é dada aos solutos, por serem estes os que com mais intensidade modificam as propriedades das membranas celulares. As soluções crioprotetoras apresentam três categorias de solutos: os sais (moléculas pequenas e com carga elétrica); os açúcares (monossacarídeos e dissacarídeos) e moléculas médias (usualmente sem carga elétrica); as macromoléculas (polímeros) (Wolfe e Bryant, 1999).

Investigações entre as interações da água e dos solutos com o coeficiente de permeabilidade das membranas (desidratação e reidratação), criaram condições para que os protocolos de vitrificação adotassem a técnica por etapas (“stepwise”) onde as soluções de desidratação, compostas por crioprotetores em concentrações mais baixas, tentam equilibrar as pressões hidráulica e osmótica sobre a membrana. É válido destacar, que o grau de desidratação (moderado ou severo) é diretamente proporcional ao tempo de exposição, temperatura e composição destas soluções (Ishimori et al., 1992).

Outras alternativas que objetivam amenizar os efeitos deletérios das soluções crioprotetoras, defendem a aceleração nas manipulações efetuadas com o resfriamento e aquecimento dos embriões, o que tem sido proporcionado através de modificações nos sistemas de envase em palhetas, inicialmente demonstradas por Vajta com a técnica OPS (Vajta et al., 1997 e Vajta et al., 1998). Opções de envase que diminuem o volume de solução crioprotetora e ao mesmo tempo auxiliam nos processos de trocas de calor, pela composição dos materiais que as constituem (plástico, vidro, alumínio, silicone, poliestireno entre outros) têm sido objeto de vários experimentos (Lane et al., 1999a; Lane et al., 1999b; Lane e Gardner, 2001; Kong et al., 2000; Dinneyes et al., 2000) e contribuído para o aumento das taxas de sobrevivência embrionária. A retirada do crioprotetor é uma etapa conduzida através do contato direto entre o crioprotetor e a solução diluente, o que proporciona uma reidratação imediata, evitando que lesões celulares irreversíveis interrompam o desenvolvimento embrionário. A flexibilidade desses métodos torna o emprego prático da vitrificação dependente das condições oferecidas por uma variedade de protocolos.

Em termos gerais, o artigo apresentado neste trabalho envolve técnicas de criopreservação com fundamentos diferenciados. Sabemos que o congelamento mantém até os dias de hoje os mesmos métodos dependentes de um equipamento controlador da curva de resfriamento e das poucas variações nas soluções crioprotetoras. Já a vitrificação, apresenta grande flexibilidade em todas as etapas envolvidas, permitindo inovações e intervenções que partem dos princípios básicos, mas aceitam modificações na tentativa de se obter resultados de sobrevivência embrionária mais eficientes.

2 ARTIGO

2.1 RESUMO

VITRIFICAÇÃO DE EMBRIÕES *Mus domesticus domesticus* CONTIDOS EM VOLUMES DIFERENTES DE 9,0 M DE ETILENO GLICOL

Os experimentos tiveram como objetivo determinar a taxa de eclosão dos embriões vitrificados em volumes diferentes de 9,0 M de etileno glicol. Simultaneamente, testou-se dois procedimentos de estocagem dos fios de teflon, denominados caixa de aço inoxidável e globete/raque. No experimento I, os 881 embriões coletados foram distribuídos em 4 tratamentos: tratamento 1 (T1= controle): 307 embriões foram cultivados in vitro em meio PBSm, acrescido de 0,4% de BSA; tratamento 2 (T2): 292 embriões foram expostos à solução de glicerol 10% acrescida de 0,4% de BSA, envasados em palhetas de 0,25 mL e submetidos ao congelamento pelo método rápido em Biocool®; tratamento 3 (T3): 138 embriões foram expostos durante 2 minutos à solução de desidratação (10% de EG + 6% BSA em PBSm) e então transferidos para a solução de vitrificação (50% de EG + 6% de BSA em PBSm), onde permaneceram por 30 segundos e foram colocados em volume de 1 µL no interior de um fio de teflon, medindo 0,4 mm de diâmetro, 2,0 cm de comprimento e 0,05 mm de espessura. Os fios foram acondicionados em uma caixa de aço inoxidável para serem armazenados em nitrogênio líquido; tratamento 4 (T4): 144 embriões foram expostos à solução de desidratação (10% de EG + 6% BSA em PBSm) e após 2 minutos, foram transferidos para a solução de vitrificação (50% de EG + 6% BSA em PBSm), onde permaneceram por 30 segundos, sendo após transferidos para um volume de 1 µL no interior do fio de teflon. Os fios de teflon foram estocados em globetes unidos às raques e mantidos em nitrogênio líquido. Após o aquecimento, os embriões foram cultivados em PBSm suplementado com 0,4% de BSA. As taxas de eclosão

embrionária observadas foram: T1=76,29% (245/307); T2=41,05% (117/292); T3=37,98% (54/138) e T4=26,78% (37/144). No segundo experimento, 747 embriões foram distribuídos em 3 tratamentos: tratamento 1 (T1= controle): 80 embriões foram cultivados in vitro em meio KSOM acrescido de 0,4% de BSA; tratamento 2 (T2): 334 embriões expostos em solução de glicerol 10% acrescida de 0,4% de BSA, foram envasados em palhetas de 0,25 mL e submetidos ao congelamento pelo método rápido em Biocool[®]; tratamento 3 (T3): 333 blastocistos foram expostos durante 2 minutos à solução de desidratação (10% de EG + 0,4% BSA em PBSm) e então transferidos para tubos eppendorf de 2,0 mL em contato com a solução de vitrificação (50% de EG + 0,4% BSA em PBSm). Após o cultivo in vitro, as taxas de eclosão embrionária observadas nos 3 tratamentos foram respectivamente: 88,75% (71/80), 40,44% (141/334) e 19,70% (66/333). Baseado nesses resultados conclui-se que embriões *Mus domesticus domesticus* submetidos à técnica de vitrificação após exposição à solução de 9,0 M de etileno glicol e envase em fios de teflon assegurou índices satisfatórios de sobrevivência embrionária. As taxas de sobrevivência dos embriões *Mus domesticus domesticus* foi independente do procedimento de estocagem em botijão de nitrogênio líquido. A vitrificação em solução de 9,0 M de etileno glicol com envase em tubos eppendorf não foi eficiente para promover altas taxas de sobrevivência embrionária, mas proporcionou segurança biológica aos embriões, durante o armazenamento.

Palavras Chave: vitrificação, embriões murinos, envase, estocagem, etileno glicol.

2.2 ABSTRACT

VITRIFICATION OF *Mus domesticus domesticus* EMBRYOS EXPOSED TO DIFFERENTS VOLUMES OF 9.0 M ETHYLENE GLYCOL SOLUTION

*This work was performed with *Mus domesticus domesticus* embryos to verify the in vitro viability of vitrified embryos using differents volumes of ethylene glycol-based solution. The experiment I consisted of four treatments. The 881 collected embryos were arranged as follows: treatment 1(control): 307 fresh embryos were cultured in vitro in PBSm + 0.4% BSA without being exposed to either dehydration or cryoprotectants agents; treatment 2: 292 embryos were loaded into 0.25 mL french straws containing 10% glycerol + 0.4% BSA in PBSm and after 10 minutes the straws were submitted to the rapid-freezing procedure (Biocool[®], controlled freezer); treatment 3:138 embryos were exposed during 2 minutes to a dehydration solution (10% ethylene glycol + 6% BSA in PBSm) and then transferred to the vitrification solution (50% ethylene glycol + 6% BSA in PBSm) in teflon wire with 0.4 mm diameter, 2 cm length and 0.05 mm thickness containing the drop of 1 μ L volume, and placed into stainless steel box for the storage in LN₂; treatment 4:144 embryos were exposed to a dehydration solution (10% ethylene glycol + 6% BSA in PBSm) and after 2 minutes were transferred to the teflon wire, that was previously loaded with 1 μ L of the vitrification solution (50% ethylene glycol + 6% BSA in PBSm). Finally, the teflon wires were placed into plastic globets attached to aluminum canes and maintained in LN₂. After thawing, the embryos were serially washed in PBSm, and then cultured in PBSm supplemented with 0.4% BSA. The hatched blastocyst*

rates observed in the treatments were: T1=76.29% (245/307); T2=41.05% (117/292); T3=37.98% (54/138) and T4=26.78% (37/144). In the second experiment, 747 embryos were arranged as follows: treatment 1(control): consisted of 80 fresh embryos cultured in vitro in KSOM medium + 0.4% BSA without being exposed to either dehydration or cryoprotectants agents; treatment 2: 334 embryos were loaded into 0.25 mL french straws containing 10% glycerol + 0.4% BSA in PBSm and after 10 minutes the straws were submitted to the rapid-freezing procedure (Biocool[®], controlled freezer); treatment 3: 333 embryos were exposed during 2 minutes to a dehydration solution (10% ethylene glycol + 0.4% BSA in PBSm) and then transferred to the eppendorf tubes loaded with the vitrification solution (50% ethylene glycol + 0.4% BSA in PBSm). After in vitro culture, the hatched blastocysts rates observed were: T1=88.75% (71/80); T2=40.44% (141/334) and T3=19.70% (66/333). Based on these results it is concluded that the embryos of *Mus domesticus domesticus* submitted to vitrification procedure after being exposed to 9.0 M of ethylene glycol – based solution and loaded in teflon wires were efficient to promote satisfactory embryo survival rates. The survival rate of *Mus domesticus domesticus* embryos was independent of the LN₂ storage procedure. The vitrification procedure after being exposed to 9.0 M of ethylene glycol – based solution and loaded in eppendorf tubes were not efficient to promote high embryo survival rate, but to warrant the embryo's biological security during storage in liquid nitrogen.

Key words: vitrification, mouse, embryos, load, ethylene glycol.

2.3 INTRODUÇÃO

A vitrificação tornou-se uma alternativa para criopreservação de células e de tecidos. Recentemente, seu sucesso tem aumentado as expectativas em diversas áreas de conhecimento envolvidas com a preservação de gametas e embriões (Kuleshova e Lopata, 2002). As interações entre a composição bioquímica das células, e as propriedades das soluções crioprotetoras, estão associadas à presença de polímeros, açúcares, ou outras macromoléculas sintéticas e/ou biológicas (Titterington et al., 1995), aos métodos de desidratação celular e ao tipo de crioprotetor (Kuleshova et al., 1999). O desafio para se obter êxito na criopreservação de embriões consiste em estabelecer-se uma adequada sequência de eventos envolvendo a composição da solução crioprotetora, passando pelo tempo de desidratação celular e o coeficiente de permeabilidade do crioprotetor com a finalidade de evitar que as injúrias tóxicas e/ou osmóticas atinjam a estrutura celular.

O conceito de que células e tecidos podem ser rapidamente resfriados não havendo tempo para a formação de gelo foi proposto a mais de 60 anos, quando foram realizados experimentos a respeito da obtenção do estado vítreo em baixas temperaturas (Luyet, 1969).

Rall e Fahy, em 1985, obtiveram sucesso com a vitrificação de embriões murinos. Os modelos experimentais testados, a partir deste momento, procuraram identificar alternativas adequadas para vitrificar embriões mamíferos com taxas de sobrevivência semelhantes às observadas no cultivo *in vitro*. Diferentes combinações de crioprotetores (propileno glicol e glicerol, dimetilsulfóxido e etileno glicol) têm sido propostas para vitrificação de células e tecidos biológicos (Kasai et al., 1992b). Os procedimentos de vitrificação são comumente empregados para criopreservação de embriões de equinos (Oberstein et al., 2001), murinos (Stachecki et al., 2002), coelhos (López-Béjar e López-Gatius, 2002),

bovinos (Pugh et al., 2000) suínos (Françoise et al., 2000), ovinos (Isachenko et al., 2003) e humanos (Mukaida et al., 1998).

O aparecimento de tendências que sugerem a imersão em nitrogênio líquido de envoltórios plásticos de várias formas, diâmetro e espessura (Vajta et al., 1997; Vajta et al., 1998; Lane et al., 1999a; Lane et al., 1999b; Lane e Gardner, 2001), microcapilares (Kong et al., 2000), folhas de papel alumínio (Dinneyses et al., 2000), grades de microscopia eletrônica (Park et al., 1999), tem garantido desenvolvimento embrionário superior ao obtido com as palhetas convencionais de 0,25 mL. As necessidades de um resfriamento cada vez mais rápido, conseguido através da redução do volume da solução crioprotetora (menos de 1 μ L) ou das modificações na composição e na forma dos recipientes aplicados no envase, procuram viabilizar a aceleração do processo de trocas de calor (Fahy et al., 1984) e ao mesmo tempo prevenir a formação heterogênea de gelo (Luyet, 1969). A espessura e origem dos materiais em contato com a superfície do continente armazenado, além da facilidade na estocagem e versatilidade no manuseio, aumentam a segurança nas manipulações e garantem uma conservação por períodos indeterminados. Já comprovou-se que a redução do volume da solução de vitrificação, através da utilização de grades de microscopia eletrônica ou palhetas esticadas (Park et al., 1999; Arav e Zeron, 1997; Vajta et al., 1997 e Vajta et al., 1998) contribui para o aumento das taxas de sobrevivência embrionária. A manipulação excessiva para a recuperação dos embriões após o aquecimento, também pode representar uma barreira a ser transposta. Recentemente foram descritas alternativas como as micropipetas de vidro (Kong et al., 2000) e o tubo de nylon (“nylon loop”) (Lane et al., 1999a; Lane et al., 1999b; Lane e Gardner, 2001) que proporcionam além de facilidade na manipulação, altas taxas de resfriamento e aquecimento em curto período de contato (menos de 30 segundos) dos embriões com a solução crioprotetora altamente concentrada.

De acordo com Martínez et al., (2002), a espécie do embrião exerce influência nos resultados da vitrificação, além disso, o estágio de

desenvolvimento e a origem do embrião (in-vivo ou in-vitro) devem ser considerados na determinação da eficiência da técnica. Os efeitos do estágio de desenvolvimento embrionário, como por exemplo blastocistos (inicial, expandido, e/ou em eclosão) também interferem nos resultados.

Macromoléculas sintéticas (PVP, Percoll), polímeros (ficoll, dextran) além de monossacarídeos e dissacarídeos (sacarose, trehalose) têm sido associadas à constituição de vários crioprotetores, na tentativa de diminuir a toxicidade das soluções de vitrificação. Mesmo nestas combinações, a base da solução mais comumente utilizada ainda consiste de altas concentrações (a partir de 30%) de crioprotetores permeáveis, sendo que alguns protocolos estabelecem em sua composição, soluções que incluem crioprotetores não-permeáveis (Shaw et al., 1997; Kuleshova et al., 2001).

Este artigo apresenta dois experimentos que tiveram como objetivo testar duas técnicas de vitrificação. No experimento I, os embriões foram envasados em fios de teflon em solução de 50% EG + 6% BSA em PBSm e estocados em caixa de aço inoxidável ou em globetes unidos às raques, ambos armazenados em botijão de nitrogênio líquido. No experimento II, os embriões foram envasados em tubos eppendorf de 2,0 mL em solução de 50% EG + 0,4% BSA em PBSm.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e coleta de embriões

Os experimentos foram realizados com camundongos da espécie *Mus domesticus domesticus*, linhagem CF1 suíça albina. As fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas, foram fornecidas pela Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, e passavam por um período de adaptação de 2 semanas, alojadas em gaiolas coletivas no biotério. Os machos entre 2 e 10 meses de idade, eram mantidos em gaiolas individuais. Os animais ficavam sob um ciclo de luz de 14 horas diárias (das 8 às 22 horas) com

temperatura regulada em 22 ± 2 °C e recebiam alimentação e água “ad libitum”.

A superovulação das fêmeas foi induzida através da aplicação de 10 UI (0,1 mL) de eCG via intraperitoneal, seguida da aplicação de 10 UI (0,1 mL) de hCG 48hs após (Rafferty, 1990). Após a aplicação do hCG, as fêmeas foram colocadas nas caixas individuais dos machos para o acasalamento, na proporção de 2 fêmeas por macho. A constatação da cópula era feita na manhã seguinte, entre 8 e 9 horas, com a verificação da presença do tampão muco gelatinoso na vagina da fêmea. A coleta dos embriões ocorreu na manhã do quarto dia após a observação da placa vaginal, quando atingiam o estágio de mórula e blastocisto. As doadoras eram sacrificadas por deslocamento cervical, tinham os cornos uterinos removidos e perfundidos com 0,5 mL de PBSm (Solução salina fosfatada tamponada de Dulbecco-Vogt (1954), modificada por Whittingham (1971), sob lupa estereomicroscópica (Nikon®), com luz incidente e magnitude de 10X. A solução de PBSm tinha o pH ajustado entre 7,15 e 7,35, e a osmolaridade entre 270 e 290 mOsm. No momento do uso, a solução era filtrada em membrana de 0,22 μ m e acrescida de 0,4% de BSA (SIGMA 1080657). Os embriões eram examinados em aumento de 60X para posterior identificação e seleção das estruturas embrionárias seguindo o critério de integridade morfológica padronizado pela IETS (Stringfellow e Seidel, 1999).

As mórulas e blastocistos iniciais selecionados foram distribuídos de modo que uma parte do total recuperado nos 2 cornos uterinos de cada fêmea, fosse utilizado em cada tratamento.

Experimento I

No experimento I, os tratamentos consistiram em: cultivo in vitro para controle de qualidade dos embriões (T1); congelamento pelo método rápido (T2); vitrificação em fio de teflon com estocagem em caixa de aço inoxidável (T3); vitrificação em fio de teflon com estocagem em globete/raque (T4).

Os embriões do tratamento controle foram cultivados em meio PBSm acrescido de 0,4% de BSA. Para o tratamento congelamento pelo método rápido, os embriões foram expostos à solução crioprotetora (SC) composta de 10% de glicerol (GLY), diluído em PBSm suplementado com 0,4% de BSA, onde permaneceram por 10 minutos à temperatura ambiente (20 a 25 °C). Os embriões foram envasados em palhetas de 0,25 mL, preenchidas com glicerol, de forma que a coluna líquida central, contendo os embriões, estivesse separada das colunas externas, por duas pequenas colunas de ar. As palhetas foram transferidas para a câmara da máquina de congelação (Biocool®) contendo metanol a -7 °C. Decorridos 10 minutos, realizou-se, com auxílio de uma pinça metálica, a indução manual da cristalização (“seeding”), e após 10 minutos iniciava-se a curva de resfriamento. O resfriamento do metanol ocorreu com intervalo de 0,3 °C/min. até atingir a temperatura de -35 °C, sinalizando o término da curva de congelamento. Após 10 minutos nesta temperatura, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas à temperatura de -196 °C, em botijão de nitrogênio líquido.

O aquecimento dos embriões ocorreu após 48 horas de estocagem (período mínimo), as palhetas foram descongeladas, permanecendo 10 segundos em ar, e 30 segundos em banho-maria à temperatura de 32 °C. A SC foi removida após a passagem dos embriões em soluções de GLY 7,5%, 5% e 2,5% com permanência destes durante 3 minutos em cada concentração, antes de serem lavados em PBSm. Os embriões foram colocados em gotas de 80 µL deste meio, acrescido de 0,4% de BSA contidos em placa de Petri (Nunc® 35 x 10 mm), cobertas com óleo

mineral (Sigma 198410) e mantidas em estufa (Forma Scientific®) à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa do ar.

Os embriões vitrificados foram envasados em fios de teflon, que consistiam de fragmentos com 0,4 mm de diâmetro, 2 cm de comprimento e 0,05 mm de espessura de parede. Os embriões foram vitrificados utilizando como solução de desidratação (SD) 10% de EG diluído em PBSm acrescido de 0,4% de BSA, e como solução de vitrificação (SV) 50% de EG diluído em PBSm acrescido de 6% de BSA, em temperatura ambiente.

As soluções crioprotetoras foram distribuídas em placas de Petri (Nunc® 35x10mm), inicialmente os embriões permaneciam 2 minutos na SD. Após, eram transferidos para a SV, onde permaneciam 30 segundos sendo então colocados no interior do fio de teflon, em volume aproximado de 1 µL. Antes de receber os embriões, o fio de teflon era lubrificado com a SV. Para facilitar a manipulação dos fios de teflon eles foram estocados testando-se dois procedimentos de acondicionamento no canister do botijão de nitrogênio líquido. No T3, os fios de teflon ficavam dispostos em posição horizontal, no interior de uma caixa de aço inoxidável de 4,5 cm x 3,0 cm, com tampa, e preenchida com nitrogênio líquido. No T4, os fios de teflon ficavam dispostos verticalmente, no interior de globetes tradicionais unidos às raques metálicas. Ambos eram armazenados em posição vertical no botijão de nitrogênio líquido.

Para a diluição do crioprotetor, os embriões envasados em fios de teflon foram retirados dos recipientes de estocagem, aquecidos rapidamente em ar (20 a 25 °C) por 5 segundos e depositados diretamente em placa de vidro relógio contendo 3 mL de PBSm acrescido de 0,4% de BSA à temperatura de 37 °C. Com o auxílio de uma agulha hipodérmica acoplada à seringa de 0,1 mL os embriões eram expelidos do interior do fio de teflon e imediatamente lavados em gotas de PBSm acrescido de 0,4% de BSA. Após 2 lavagens, os embriões eram transferidos para gotas de 80 µL do mesmo meio em placas de Petri (Nunc® 35 x 10 mm),

cobertas com óleo mineral (Sigma 198410) e mantidas em estufa (Forma Scientific®) à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa do ar.

Experimento II

No experimento II, os tratamentos consistiram em: cultivo in vitro para controle de qualidade dos embriões (T1); congelamento pelo método rápido (T2); vitrificação em tubos eppendorf (T3).

Os embriões do tratamento controle foram cultivados em meio KSOM (modificado por Erbach et al., 1994) suplementado com 0,4% de BSA. No congelamento pelo método rápido os embriões foram tratados conforme o procedimento descrito no experimento I.

Os embriões vitrificados foram envasados em tubos eppendorf de 2,0 mL, que consistiam de material plástico de poliestireno com 0.5 cm de diâmetro, 3 cm de altura e 0,5 mm de espessura de parede. Os embriões foram vitrificados utilizando como solução de desidratação (SD) 10% de EG diluído em PBSm acrescido de 0,4% de BSA, e como solução de vitrificação (SV) 50% de EG diluído em PBSm acrescido de 0,4% de BSA, em temperatura ambiente (20 a 25 °C).

As soluções crioprotetoras foram distribuídas em placas de Petri (Nunc® 35 x 10 mm). Primeiramente, os embriões permaneciam 2 minutos na SD, após eram transferidos, com auxílio de uma pipeta de vidro acoplada a um controlador bucal, preenchida com a solução de vitrificação para o interior dos tubos eppendorf em volume aproximado de 3 µL.

Antes de receber os embriões, os tubos eppendorf eram identificados, colocados em uma caixa de isopor com capacidade para armazenar 6 tubos. A caixa encontrava-se preenchida com nitrogênio líquido a um nível que possibilitava que a porção inferior dos tubos eppendorf permanecesse mergulhada no nitrogênio. Após receber os embriões os tubos eram fechados, e estocados em raques no botijão criogênico.

Para a desvitrificação dos embriões, foram utilizadas 2 soluções de sacarose com concentrações de 1,0 M (S₁) e 0,5 M (S₂). Os tubos eppendorf foram liberados das raques com auxílio de um fórceps, sendo que cada tubo foi aquecido individualmente. A caixa de isopor com a tampa perfurada, preparada para receber os tubos eppendorf, era preenchida com água à temperatura de 30 °C. O tubo era transferido diretamente do botijão criogênico para esta caixa de isopor. Neste momento, adicionava-se 1 mL de S₁ à solução crioprotetora, no interior do tubo. Após 3 minutos, o conteúdo líquido era retirado do tubo eppendorf e transferido para uma placa de Petri (Nunc® 35 x 10 mm), que continha 3 mL de S₁. Após a identificação das estruturas embrionárias, estas eram transferidas para solução S₂ onde permaneciam 3 minutos, antes de serem lavadas em solução de PBSm acrescida de 0,4% de BSA. Após a lavagem, os embriões eram mantidos nos poços da placa de Petri (Nunc® 35 x 10 mm), contendo gotas de 80 µL do meio KSOM, cobertas com óleo mineral (Sigma 198410) em estufa (Forma Scientific®) a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade relativa do ar.

Avaliação da viabilidade embrionária

Os embriões foram avaliados às 24 e 48 horas de cultivo. O critério de viabilidade adotado para todos os tratamentos consistiu na observação da expansão e eclosão dos embriões.

Para análise dos dados, foi empregado o teste ANOVA e para a comparação múltipla entre as médias dos tratamentos foi efetuado o teste de Tukey-Kramer (NS=5%), baseando-se nas taxas de expansão e eclosão. Para todas as análises utilizou-se o software SAS, versão 8.2.

2.5 RESULTADOS

No experimento I, os resultados de viabilidade embrionária (Tabela I) revelaram diferença significativa entre os tratamentos independente do estágio de desenvolvimento ser a expansão ou a eclosão. Quanto a capacidade de eclosão embrionária observada após o aquecimento dos embriões, o tratamento controle foi superior aos demais (T1=76,29%). Os embriões submetidos à vitrificação com estocagem em caixa de aço inoxidável não apresentaram diferença significativa dos embriões congelados pelo método rápido (T2=41,05% e T3=37,98%). O tipo de estocagem não teve efeito significativo sobre as taxas de sobrevivência embrionária após a vitrificação (T3=37,98% e T4=26,78%).

TABELA I: Taxas de expansão e eclosão após aquecimento e cultivo in vitro de embriões *Mus domesticus domesticus* vitrificados, envasados em fios de teflon, e submetidos a dois acondicionamentos para estocagem.

Tratamentos	Embriões	Expansão		Eclosão	
	n*	n	(%)	n	(%)
Controle	307	301	97,57 ^a	245	76,29 ^a
Congelamento Rápido	292	145	50,81 ^b	117	41,05 ^b
Vitrificação Caixa inox.	138	61	42,49 ^{bc}	54	37,98 ^{bc}
Vitrificação Globete/ raque	144	41	31,11 ^c	37	26,78 ^c

a, b, c : médias seguidas pela mesma letra não se diferenciam significativamente pelo teste de Tukey-Kramer (NS=5%).

* 10 replicações

No experimento II, houve diferença significativa entre os 3 tratamentos (Tabela II). Nas taxas de sobrevivência embrionária, o tratamento controle (T1=88,75%), foi significativamente superior aos demais. Os embriões submetidos ao congelamento pelo método rápido (T2=40,44%),

apresentaram desenvolvimento embrionário superior aos vitrificados em tubos eppendorf (T3=19,70%).

TABELA II: Taxas de expansão e eclosão após aquecimento e cultivo in vitro de embriões *Mus domesticus domesticus* vitrificados, envasados em tubos eppendorf.

Tratamentos	Embriões n*	Expansão n (%)	Eclosão n (%)
Controle	80	78 97,50 ^a	71 88,75 ^a
Congelamento Rápido	334	183 53,52 ^b	141 40,44 ^b
Vitrificação	333	93 28,14 ^c	66 19,70 ^c

a, b, c : médias seguidas pela mesma letra não se diferenciam significativamente pelo teste de Tukey-Kramer (NS=5%).

* 4 replicações

2.6 DISCUSSÃO

Os diferentes volumes de 9,0 M de EG utilizados nestes experimentos foram obtidos através do envase dos embriões em fios de teflon (volume= 1 µL) ou tubos eppendorf (volume= 3 µL).

Dentre as características do crioprotetor, está o seu baixo peso molecular, que facilita sua rápida permeação para o interior das células durante um curto período de exposição. A exposição dos embriões a uma elevada concentração de etileno glicol, não causa efeitos deletérios decorrentes de toxicidade. Estas observações foram verificadas por Cortês e Rodrigues, (2000), quando fizeram teste de toxicidade que consistiu da exposição de embriões de camundongo à solução de 9,0 M de EG seguida do cultivo in vitro. Nos experimentos de vitrificação que utilizam o etileno glicol como crioprotetor, o tempo de desidratação dos embriões é um efeito importante que deve ser considerado para o sucesso da vitrificação. De acordo com Aguiar et al., (1997) o tempo ideal de exposição dos embriões à solução de vitrificação deve ser identificado,

para que as células embrionárias sejam penetradas por concentrações adequadas deste crioprotetor.

A temperatura de desidratação e reidratação dos embriões é outro fator a ser destacado na execução destes experimentos. Via de regra, antes da vitrificação, os embriões são manipulados à temperatura ambiente, sem um rigoroso controle. Os efeitos da temperatura durante a exposição aos crioprotetores não têm sido, até o momento, extensivamente pesquisados. Vajta et al., (1999), demonstrou através dos resultados de sobrevivência in vitro de blastocistos bovinos, que a temperatura na qual os embriões são expostos às soluções de desidratação e reidratação influencia as taxas de desenvolvimento embrionário. Assim, quando a temperatura dos meios de desidratação e reidratação foi ajustada para 20 °C ao invés da temperatura padrão de 35°C, as respectivas taxas de expansão e eclosão embrionária diminuíram de 97% e 72% para 31% e 17%. Nos dois experimentos apresentados no presente trabalho, a temperatura de desidratação variou entre 20 e 25°C e a de reidratação foi de 37 e 30°C para os experimentos I e II respectivamente. Essa variação nas temperaturas de desidratação e reidratação pode ter influenciado os resultados de vitrificação nos dois experimentos. De acordo com Wolfe e Bryant, (1999) o coeficiente de permeabilidade do crioprotetor e sua condutividade hidráulica variam com a temperatura, o que permite o cálculo aproximado da temperatura para adição, remoção, resfriamento e aquecimento em função da solução crioprotetora utilizada.

No experimento I, testou-se a viabilidade embrionária após o envase dos embriões em fios de teflon e simultaneamente, em virtude da necessidade de serem conservados por períodos de tempo indeterminados, testou-se duas formas distintas de estocagem em botijões de nitrogênio líquido. Com esta finalidade foi adotado no T3, um método de estocagem dos fios de teflon em caixa de aço inoxidável, proporcionando uma manipulação fácil e segura. Após a vitrificação dos embriões, a caixa de aço inoxidável permanecia no interior da caixa de isopor, permitindo a manipulação dos

fios de teflon, que continuavam imersos em nitrogênio líquido até o armazenamento nos botijões. Este procedimento também proporcionou facilidade de manipulação durante o aquecimento, pois permitiu que os fios de teflon pudessem ser removidos do caníster, em contato com o nitrogênio líquido. No T4, os fios de teflon eram colocados diretamente na caixa de isopor, onde permaneciam flutuando na superfície do nitrogênio líquido. Esse comportamento continuava durante o período de envase dos outros embriões. E dificultava também a estocagem dos fios de teflon quando eles eram colocados nos globetes.

A estocagem assegurou que o tempo decorrido desde o primeiro envase fosse considerado, na avaliação dos dois procedimentos, e que o contato entre a superfície do fio de teflon e o nitrogênio líquido fosse observado. Por este motivo, apesar do volume da gota que contém a solução crioprotetora ser reduzido (próximo a 1 μL), a taxa de resfriamento na área de flutuação é menor do que na área de imersão.

Para a diluição do crioprotetor, todos os embriões vitrificados foram reidratados em solução de PBSm suplementada com 0,4% de BSA. A reidratação direta dos embriões tem sido testada em vários protocolos, para diferentes espécies com efetividade comprovada. Além disso, a reidratação direta em solução isotônica acelera o processo de desvitrificação. A rapidez nos procedimentos de vitrificação e desvitrificação atingida com a utilização dos fios de teflon, contribuiu de forma significativa com os resultados obtidos no experimento I. O aperfeiçoamento dos métodos de envase, contribuiu para que novos procedimentos de remoção de crioprotetores adaptem-se também às rotinas de transferência embrionária, atendendo aos aspectos práticos da utilização dessas técnicas.

No experimento II, testou-se a viabilidade dos embriões vitrificados, envasados em tubos eppendorf. O objetivo da utilização deste envase foi evitar o contato direto do nitrogênio líquido com os embriões. A multifuncionalidade dos tubos eppendorf nos procedimentos de envase de

material é mundialmente difundida nas rotinas laboratoriais. A adaptação deste recipiente para o envase de embriões na vitrificação, facilita a manipulação, proporcionando rapidez nos procedimentos. A transparência do material também é importante pois permite a visualização do estado vítreo da solução crioprotetora após a imersão em nitrogênio líquido. Outra vantagem dos tubos eppendorf é que eles, após serem identificados, podem ser estocados em botijão criogênico acoplados diretamente às raques.

De acordo com Kong et al., (2000), o principal inconveniente do armazenamento de células em contato direto com o nitrogênio líquido, é o aumento do risco de contaminação através de microorganismos que permanecem ativos em baixas temperaturas. Sendo assim, o próximo passo consiste em determinar modelos eficazes de estocagem dos envases, que possam permanecer longos períodos em contato direto com o nitrogênio líquido e que ofereçam segurança biológica às células, principalmente na embriologia humana. López-Béjar e López-Gatius (2002) modificaram o método original do OPS (mOPS) descrito por Vajta et al., (1997; 1998) para reduzir o risco de contaminação pelo nitrogênio líquido, lacrando a porção mais estreita da palheta com álcool - polivinílico. Procedimentos que envolvem o lacre dos envases são recomendados, mas na vitrificação, o tempo que é gasto nessas manipulações pode prejudicar a eficiência da técnica.

2.7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos nestes experimentos, indica que a vitrificação em solução de 9,0 M de etileno glicol com envase em fios de teflon, assegurou índices satisfatórios de sobrevivência embrionária, determinados através da taxa de eclosão. Os dois procedimentos testados para estocagem, não influenciaram o desenvolvimento in vitro dos embriões envasados em fios de teflon, mas a utilização da caixa de aço

inoxidável facilitou a manipulação em todas as etapas. A eficiência da técnica de vitrificação em fios de teflon, foi semelhante a obtida com o congelamento. A rapidez atingida na realização do procedimento que utilizou a caixa de aço inoxidável, pode ter contribuído para que as taxas de eclosão tenham sido semelhantes às do congelamento pelo método rápido.

A vitrificação em solução de 9,0 M de etileno glicol com envase em tubos eppendorf não foi eficiente para promover altas taxas de sobrevivência embrionária, mas proporcionou segurança biológica aos embriões, durante o armazenamento.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nas últimas duas décadas os avanços na biotecnologia revolucionaram os conceitos da biologia que envolvem o desenvolvimento inicial dos mamíferos. Recentes descobertas na manipulação de gametas (oócitos e espermatozoides), de embriões e de células têm modificado e aperfeiçoado conceitos reprodutivos. Assim como a transferência nuclear, a microinjeção, a transgênese e a vitrificação, no contexto das tecnologias tem permitido o uso de protocolos diferenciados para possibilitar o incremento dos resultados e melhorias na sua aplicabilidade prática.

Mesmo com o aparecimento de inúmeras opções de envase que tentam aperfeiçoar as etapas da vitrificação, recentemente a embriologia experimental alcançou êxito com a vitrificação de oócitos humanos maduros, envasados em palhetas convencionais de 0,25 mL (Chen et al., 2000). De acordo com Acker e McGann, (2000), além da criopreservação de embriões, esta área do conhecimento vem sendo empregada com outros tipos de células, como por exemplo, cardíacas, hepáticas, renais e da córnea. Esse progresso alcançado pela criobiologia oferece a possibilidade de criação de bancos de gametas femininos que podem ser

direcionados à modernização dos setores de reprodução assistida, bem como ao aumento na eficiência da produção animal.

Ainda no contexto das possibilidades de envase, a técnica da vitrificação tem buscado alternativas para aperfeiçoar as formas mais adequadas de estocagem dos embriões e oócitos criopreservados. Estas alternativas não garantem a viabilidade embrionária, mas colaboram, facilitando as manipulações e também proporcionando proteção aos gametas e embriões, pois diferentes vírus podem sobreviver à exposição direta ao nitrogênio líquido e tornarem-se agentes potenciais de contaminações e patologias.

As respostas a muitas das questões levantadas em diferentes experimentos desenvolvidos nesta área, envolvendo também o uso de protocolos de congelamento convencional, derivam das teorias inicialmente apresentadas ao longo da história da criopreservação, principalmente nos conceitos formados a partir da criopreservação de células. As considerações abordadas neste trabalho somam-se às conquistas atingidas pela embriologia experimental, e contribuem para o aperfeiçoamento progressivo de técnicas, que no decorrer dos anos, irão consolidar sua eficiência.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKER, J.P.; MCGANN, L.E. Cell-cell contacts affect membrane integrity after freezing. *Cryobiology* v. 40, p. 56-63, 2000.

AGUIAR, P.R.L.; BERTOLINI, M.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Vitriificação de embriões *Mus musculus* em 9,0 M de etileno glicol. *Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, v. 25, p. 21-29, 1997.

ARAV, A.; ZERON, Y. Vitriification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is affected by the composition and concentration of the vitriification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology*, v. 47, p. 341, 1997.

CHEN, S.U.; LIEN, Y.R.; CHAO K.H.; LU, H.F.; HO, H.N.; YANG, Y.S. Cryopreservation of mature human oocytes by vitriification with ethylene glycol in straws. *Fertil. Steril.* v.74, p. 804-808, 2000.

CORTÊS, P. C. G.; RODRIGUES, J. L. Sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitriificados em meio contendo 9,0 M de etileno glicol na presença de sacarose. *Ciência Rural*, v. 30, p. 461-467, 2000.

DINNEYES, A.; DAÍ, Y.; JIANG, S.; YANG, X. Somatic cell nuclear transfer with vitriified recipient oocytes in cattle. *Theriogenology*, v. 53, p. 215, 2000.

DULBECCO, R.; VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelits viruses. *J. Exp. Med.*, v.57, p. 167-182, 1954.

ERBACH, G.T.; LAWITTS, J.A.; PAPAIOANNOU, V.E.; BIGGERS, J.D. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol. Reprod.*, v. 50, n. 5, p. 1027-1033, 1994.
Abstract.

FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. . Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, v. 21, p. 407-426, 1984.

FRANÇOISE, B.; FRANÇOISE, B-M.; LOCATELLI, A.; PERREAU, C.; TARQUI, M. Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*, v. 41, p. 116-124, 2000.

ISACHENKO, V.V.; ISACHENKO, E. F.; OSTASHKO, F.I.; GRISHCHENKO, V. I. Ultrarapid freezing of rat embryos with rapid dilution of permeable cryoprotectants. *Cryobiology*, v. 34, p. 157-164, 1997.

ISACHENKO, V.; ALABART, J.L.; DATTENA, M.; NAWROTH, F.; CAPPAL, P.; ISACHENKO, E.; COCCERO, M.J.; OLIVEIRA, J.; ROCHE, A.; ACCARDO, C.; KRIVOKHARCHENKO, A.; FOLCH, J. New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*, v. 59, p. 1209-1218, 2003.

ISHIMORI, H.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Viability of vitrified mouse embryos using various crioprotectant mixtures. *Theriogenology*, v. 37, p. 481-487, 1992.

KASAI, M.; NISHIMORI, M.; ZHU, S.E.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based

solution after exposure to the solution at various temperatures. *Biology of Reproduction*, v. 47, p. 1134-1139, 1992a.

KASAI, M.; HAMAGUCHI, Y.; ZHU, S.E.; MIYAKE, T.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Biology of Reproduction*, v. 46, p. 1042-1046, 1992b.

KONG, I.K.; LEE, S.I.; CHO, S.G.; CHO, S.K.; PARK, C. S. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology*, v. 53, p. 1817-1826, 2000.

KULESHOVA, L.L.; MAC FARLANE, D.R.; TROUNSON, A.O.; SHAW, J.M. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, v. 38, p. 119-130, 1999.

KULESHOVA, L.L.; SHAW, J.M.; TROUNSON, A. O. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology*, v. 43, p. 21-31, 2001.

KULESHOVA, L.L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility*, v. 78, p. 449-454, 2002.

KUWAYAMA, M.; FUJIKAWA, S.; NAGAI, T. Ultra-structure of IVM, IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in glycerol, 2,2-propanediol using 2-step and 16-step procedures. *Cryobiology*, v. 31, p. 415-422, 1994.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryollop container-less technique. *Fertility and Sterility*, v. 72, p. 1073-1078, 1999a.

LANE, M.; FOREST, K.T.; LYONS, E.A.; BAVISTER, B. D. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. *Theriogenology*, v. 51, p. 167, 1999b. Abstract.

LANE, M.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Molecular Reproduction and Development*, v. 58, p. 342-347, 2001.

LEIBO, S.P.; SONGSASEM, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, v. 57, p. 303-326, 2002.

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

LUYET, B. On the amount of water remaining amorphous in frozen aqueous solutions. *Biodynamica*, v. 218, p. 277-291, 1969.

MARTÍNEZ, A. G.; VACÁRCEL, A.; DE LOS HERAS, M.A.; MATOS, D.G.; FURNUS, C.; BROGLIATTI, G. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. *Animal Reproduction Science*, v. 73, p. 11-21, 2002.

MAZUR, P. *Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium* freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys*, v. 17, p. 53-91, 1990.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Brief Review. New York: Academic, p. 125-142, 1984.

MUKAIDA, T.; WADA, S.; TAKAHASHI, K.; PEDRO, P.B.; NA, T.Z.; KASAI, M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. Hum. Reprod., v. 13, p. 2874-2879, 1998.

OBERSTEIN, N.; O'DONOVAN, M.K.; BRUEMMER, J.E.; SEIDEL Jr., G.E.; CARNEVALE, 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.

PARK, P. S.; KIM, Y.E.; KIM, I.D.; PARK, H.N.; WON, S.Y.; YOON, H.S.; CHUNG, S. K.; LIM, H.J. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. Human Reproduction, v. 14, p. 2838-2843, 1999.

PUGH, P.A.; TERVIT, H.R.; NIEMANN, H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. Animal Reproduction Science, v. 58, p. 9-22, 2000.

RAFFERTY, Jr., K. A. Methods in experimental embryology of the mouse. The Johns Hopkins Press, Baltimore and London, 1990.

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

RALL, W.F.; FAHY, G. M. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C . Nature, v. 313, p. 573-575, 1985a.

RALL, W.F.; FAHY, G. M. Cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Cryobiology*, v. 22, p. 33, 1985b.

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

STACHECKI, J.J.; COHEN, J.; SCHIMMEL, T.; WILLADSEN, S. M. Fetal development of mouse oocytes and zygotes cryopreserved in a nonconventional freezing medium. *Cryobiology*, v. 44, p. 5-13, 2002.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de embriões. 3. ed. Champaign: IETS, 1999.

TITTERINGTON, J.L.; ROBINSON, J.; KILLICK, S.R.; HAY, D. M. Synthetic and biological macromolecules: protection of mouse embryos during cryopreservation by vitrification. *Hum. Reprod.*, v. 10, p. 649-653, 1995.

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.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 51, p. 53- 58, 1998.

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

WILLADSEN, S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. The viability of deep frozen cow embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 52, p. 391-393, 1978.

WILMUT, I.; ROWSON, L.E.A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *The Veterinary Record*, v. 92, p. 686-690, 1973.

WHITTINGHAM, D. G. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 14, p. 7-21, 1971.

WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-269\text{ }^{\circ}\text{C}$. *Science*, v. 178, p. 411-414, 1972.

WOLFE, J.; BRYANT G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, v. 39, p. 103-129, 1999.

APÊNDICE

TABELA I: DESEMPENHO DAS FÊMEAS NOS EXPERIMENTOS

EXPERIMENTO	FÊMEAS SUPEROVULADAS	FÊMEAS PLACA POSITIVA	FÊMEAS COM EMBRIÕES VIAVEIS
I	97	73	38
II	51	36	23
TOTAL GERAL	148	109	61

TABELA II: APROVEITAMENTO DOS EMBRIÕES EXPERIMENTO I

ESTÁGIO	CULTIVADOS	CONGELADOS	VITRIFICADOS
MÓRULAS	119	72	103
BLASTOCISTOS	188	220	179
TOTAL	307	292	282

TABELA III: APROVEITAMENTO DOS EMBRIÕES EXPERIMENTO II

ESTÁGIO	CULTIVADOS	CONGELADOS	VITRIFICADOS
MÓRULAS	40	273	00
BLASTOCISTOS	40	61	333
TOTAL	80	334	333

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO I

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:1

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 10 CHEGADA: 14/03/2002

ECG: 16/04/02 HCG:18/04/02 PLACAS: 19/04/02 Nº: 8

COLETA: 22/04/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 9:00 TÉRMINO: 9:35

LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 9:37 TÉRMINO: 10:06

TOTAL EMBRIÕES: 80 MÓR: 39 BLAST: 41

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool® CRIOPROTETOR: Glicerol 10%

EQUILÍBRIO (t/min): 10 min. SEEDING (T/ °C): -7 °C CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: FIO TEFLON CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

	CONTROLE	FIO TEFLON Nºemb./estágio	PALHETA Nºemb./estágio	ESTOCAGEM
DATA	Nºemb./estágio			
22/04	1-30 14BI+16Mo			ESTUFA
22/04		1- 4BI + 5Mo	1- 14 BI	RAQUE
22/04		2- 3BI + 4Mo	2- 09 Mo	RAQUE
22/04		3- 5BI + 5Mo		RAQUE

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	Nº EMB	QUALIDADE E	GOTA	MEIO	24 h	48 h	ECLOSÃO
23/04	Estufa	30	1	1	PBSm	30	19	23
24/04	FIO TEF.1	10	½	1	PBSm	07	04	07
24/04	FIO TEF.2	7	½	2	PBSm	04	02	02
24/04	FIO TEF.3	7	½	3	PBSm	02	02	02
24/04	PALH.1	14	½	4	PBSm	08	03	07
24/04	PALH.2	8	½	5	PBSm	05	02	04

Obs: 1(x/x); 2(20BI/10Mo); 3(15D/x); 4(12BI/18Mo); 5(15Mo/x);
6(25BI/10D); 7(x/x); 8 (x/x).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO I

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:2

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 10

CHEGADA: 14/03/2002

ECG: 18/04/02

HCG:20/04/02

PLACAS: 21/04/02

Nº: 06

COLETA: 24/04/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 9:40

TÉRMINO: 9:58

LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 10:00

TÉRMINO: 10:20

TOTAL EMBRIÕES: 57

MÓR: 22

BLAST: 35

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool®

CRIOPROTETOR: Glicerol 10%

EQUILÍBRIO (t/min): 10 min.

SEEDING (T/ °C): -7 °C

CURVA: 0,3 °C//min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: FIO TEFLON CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

DATA	CONTROLE	FIO TEFLON	PALHETA	ESTOCAGEM
	Nºemb./estágio	Nºemb./estágio	Nºemb./estágio	
24/04	1-17 10BI 07Mo			ESTUFA
24/04			1- 10 BI	RAQUE
24/04			2- 10 BI	RAQUE
24/04		1- 10 BI		C. INOX
24/04		2- 8 BI		C. INOX

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	Nº EMB	QUALIDAD	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
			E					
25/04	Estufa	17	1	1	PBSm	14	07	09
26/04	Fio TEF.1	10	½	3	PBSm	05	02	03
26/04	Fio TEF.2	8	½	4	PBSm	02	01	01
26/04	PALH.1	8	½	1	PBSm	07	04	06
26/04	PALH.2	9	½	2	PBSm	05	03	05

Obs: 1(x/05BI); 2(x/x); 3(20BI/12Mo); 4(x/x); 5(4D/10Mo); 6(10BI/02BI).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO I

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:3

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 10 CHEGADA: 12/04/2002

ECG: 23/04/02 HCG:25/04/02 PLACAS: 26/04/02 Nº: 09

COLETA: 29/04/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 9:30 TÉRMINO: 10:00

LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 10:10 TÉRMINO: 10:28

TOTAL EMBRIÕES: 72 MÓR: 23 BLAST: 49

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool® CRIOPROTETOR: Glicerol 10%

EQUILÍBRIO (t/min): 10 min. SEEDING (T/ °C): -7 °C CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: FIO TEFLON CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

	CONTROLE	FIO TEFLON Nºemb./estágio	PALHETA Nºemb./estágio	ESTOCAGEM
DATA	Nºemb./estágio			
29/04	1-20 18BI +02Mo			ESTUFA
29/04			1- 10 BI	RAQUE
29/04			2- 9 BI+1Mo	RAQUE
29/04		1- 10 BI		C. INOX
29/04		2- 8 BI + 2Mo		C. INOX

--	--	--	--	--

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	N° EMB	QUALIDAD E	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
30/04	Estufa	20	1	1	PBSm	20	09	11
09/05	FIO TEF.1	10	2/3	1	PBSm	04	00	04
09/05	FIO TEF.2	10	2/3	2	PBSm	05	02	05
09/05	PALH.1	10	2/3	3	PBSm	07	01	03
09/05	PALH.2	10	2/3	4	PBSm	07	02	05

Obs: 1(x/x); 2 (20BI/25BI); 3 (7D/x); 4(x/12D); 5(x/12Mo); 6(x/15F); 7(x/8D); 8(x/x); 9(10Mo/5BI).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO I

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:4

SUPEROVULAÇÃO:

N° FÊMEAS: 10

CHEGADA: 12/04/2002

ECG: 30/04/02

HCG:02/05/02

PLACAS: 03/05/02

N°: 9

COLETA: 06/05/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 9:15

TÉRMINO: 10:00

LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 10:05

TÉRMINO: 10:30

TOTAL EMBRIÕES: 75

MÓR: 15

BLAST: 60

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool®

CRIOPROTETOR: Glicerol 10%

EQUILÍBRIO (t/min): 10 min.

SEEDING (T/ °C): -7 °C

CURVA: 0,3 ° C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: FIO TEFLON CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

	CONTROLE	FIO TEFLON N°emb./estágio	PALHETA	ESTOCAGEM
DATA	N°emb./estágio		N°emb./estágio	
06/05	1-24 20BI 04Mo			ESTUFA
06/05			1- 10 BI	RAQUE
06/05			2- 08 BI + 2Mo	RAQUE
06/05		1- 7 BI + 3Mo		C. INOX
06/05		2- 7 BI + 3Mo		C. INOX

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	Nº EMB	QUALID ADE	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
07/05	Estufa	24	1	1	PBSm	24	18	23
08/05	FIO TEF. 1	10	½	3	PBSm	04	03	04
10/05	FIO TEF. 2	10	½	4	PBSm	03	02	02
10/05	PALH.1	10	½	1	PBSm	06	03	05
10/05	PALH.2	10	½	2	PBSm	05	04	05

Obs: 1(2BI/x); 2(10D/x); 3 (12BI/x); 4(x/x); 5(8Mo/7BI); 6(20BI/15BI); 7(7Mo/10BI); 8(2D/x); 9(x/x).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO I

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:5

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 10

CHEGADA: 26/04/2002

ECG: 1º/05/02

HCG:03/05/02

PLACAS: 04/05/02

Nº: 7

COLETA: 7/05/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 9:35

TÉRMINO: 9:49

LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 10:20

TÉRMINO: 10:35

TOTAL EMBRIÕES: 90

MÓR: 42

BLAST: 48

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool®

CRIOPROTETOR: Glicerol 10%

EQUILÍBRIO (t/min): 10 min.

SEEDING (T/ °C): -7 °C

CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: FIO TEFLON

CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50%

EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

DATA	CONTROLE Nºemb./estágio	FIO TEFLON Nºemb./estágio	PALHETA Nºemb./estágio	ESTOCAGEM
07/05	1-30 08BI + 22Mo			ESTUFA
07/05		1- 4BI + 3Mo	1- 10 Mo	RAQUE
07/05		2- 3BI + 3Mo	2- 10 Mo	RAQUE
07/05		3- 6BI + 4Mo	3- 10 BI	RAQUE
07/05			4- 10 BI	RAQUE

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	Nº EMB	QUALIDAD E	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
08/05	Estufa	30	½	1	PBSm	29	19	24
10/05	FIO TEF. 1	7	½	1	PBSm	02	00	02
10/05	FIO TEF. 2	5	½	2	PBSm	01	00	01
10/05	FIO TEF. 3	10	½	3	PBSm	06	03	05
10/05	PALH.1	8	½	4	PBSm	05	03	04

10/05	PALH.2	8	½	5	PBSm	06	02	04
10/05	PALH.3	9	½	6	PBSm	05	02	03
10/05	PALH.4	10	½	7	PBSm	07	04	06

Obs: 1(22Mo/10BI+12D); 2(06BI/04D); 3(30BI/20Mo+12D); 4(x/x); 5(15D/10D); 6(x/x); 7(08D/12D).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO I
Sabrina Silveira Assaf ROTINA:6

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 10 CHEGADA: 26/04/2002
 ECG: 07/05/02 HCG:09/05/02 PLACAS: 10/05/02 Nº: 7

COLETA: 13/05/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 9:00 TÉRMINO: 9:32
 LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 9:35 TÉRMINO: 9:55
 TOTAL EMBRIÕES: 90 MÓR: 11 BLAST: 78

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool® CRIOPROTETOR: Glicerol 10%
 EQUILÍBRIO (t/min): 10 min. SEEDING (T/ °C): -7 °C CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: FIO TEFLON CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

	CONTROLE	FIO TEFLON Nºemb./estágio	PALHETA Nºemb./estágio	ESTOCAGEM
DATA	Nºemb./estágio			
13/05	1-29 23BI + 06Mo			ESTUFA
13/05		1- 3BI + 7Mo	1- 10 BI	RAQUE
13/05		2- 4BI + 6Mo	2- 10 BI	RAQUE

13/05		3- 7BI + 3Mo	3- 06 BI + 3Mo	RAQUE

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	Nº EMB	QUALIDAD E	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
14/05	Estufa	29	½	1	PBSm	29	18	24
17/05	FIO TEF. 1	10	2/3	1	PBSm	05	01	03
17/05	FIO TEF. 2	10	2/3	3	PBSm	00	00	00
17/05	FIO TEF. 3	10	2/3	5	PBSm	04	02	04
17/05	PALH.1	10	2/3	2	PBSm	01	00	00
17/05	PALH.2	8	2/3	4	PBSm	06	04	06
17/05	PALH.3	9	2/3	6	PBSm	04	02	02

Obs: 1(5D/x); 2(30BI/10Mo+15BI); 3(30BI/x); 4(x/x); 5(4D/x); 6(10D/x); 7(3Mo+17BI/x).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO I

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:7

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 8

CHEGADA: placas negativas

ECG: 8/05/02

HCG:10/05/02

PLACAS: 11/05/02

Nº:5

COLETA: 14/05/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 9:15

TÉRMINO: 9:35

LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 10:06

TÉRMINO: 10:20

TOTAL EMBRIÕES: 71

MÓR: 37

BLAST: 34

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool®

CRIOPROTETOR: Glicerol 10%

EQUILÍBRIO (t/min): 10 min.

SEEDING (T/ °C): -7 °C

CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: FIO TEFLON CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

DATA	CONTROLE N°emb./estágio	FIO TEFLON N°emb./estágio	PALHETA N°emb./estágio	ESTOCAGEM
14/05	1-30 14BI + 16Mo			ESTUFA
14/05		1- 4BI + 5Mo	1- 16 BI	RAQUE
14/05		2- 4BI + 5Mo	2- 06 Mo	RAQUE
14/05		3- 5BI + 5Mo		RAQUE

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	N° EMB	QUALIDADE	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
15/05	Estufa	30	½	1	PBSm	30	13	28
17/05	FIO TEF. 1	10	2/3	3	PBSm	07	00	05
17/05	FIO TEF. 2	08	2/3	4	PBSm	04	01	04
17/05	FIO TEF. 3	07	2/3	5	PBSm	05	01	05
17/05	PALH.1	15	½	1	PBSm	11	02	08
17/05	PALH.2	05	½	2	PBSm	03	00	02

Obs: 1(30BI/20Mo); 2(x/x); 3(15Mo/6D); 4(10BI+3Mo/5D); 5(x/x).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO I

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA: 8

Obs: 1(10D/x); 2(x/12D); 3(x/x); 4(14BI/x); 5(10Mo/8D);
6(16MoD/21BI); 7(45BI+12Mo).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO I

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:9

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 9 CHEGADA: 03/05/2002
 ECG: 15/05/02 HCG:17/05/02 PLACAS: 18/05/02 Nº: 7
 COLETA: 21/05/02
 LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 10:00 TÉRMINO: 10:10
 LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 10:25 TÉRMINO: 10:55
 TOTAL EMBRIÕES: 181 MÓR: 72 BLAST: 109

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool® CRIOPROTETOR: Glicerol 10%
 EQUILÍBRIO (t/min): 10 min. SEEDING (T/ °C): -7 °C CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: FIO TEFLON CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

	CONTROLE	FIO TEFLON Nºemb./estágio	PALHETA Nºemb./estágio	ESTOCAGEM
DATA	Nºemb./estágio			
21/05	1-61 29BI + 32Mo			ESTUFA
21/05			1- 10 BI	RAQUE
21/05			2- 10 BI	RAQUE
21/05			3- 10 BI	RAQUE
21/05			4- 10 BI	RAQUE

21/05			5- 10 BI	RAQUE
21/05			6- 10 BI	RAQUE
21/05		1- 10 BI		C. INOX
21/05		2- 10 BI		C. INOX
21/05		3- 10 BI		C. INOX
21/05		4- 10 BI		C. INOX
21/05		5- 10 Mo		C. INOX
21/05		6- 10 Mo		C. INOX

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	Nº EMB	QUALID ADE	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
22/05	Estufa	61	½	1	PBSm	59	35	52
22/05	FIO TEF. 1	10	½	1(p.1)	PBSm	02	01	02
22/05	FIO TEF. 2	10	½	2(p.1)	PBSm	02	01	02
22/05	FIO TEF. 3	10	½	3(p.1)	PBSm	03	03	03
22/05	FIO TEF. 4	10	½	4(p.1)	PBSm	04	03	04
22/05	FIO TEF. 5	10	½	5(p.1)	PBSm	03	01	03
22/05	FIO TEF. 6	08	½	6(p.1)	PBSm	02	01	02
22/05	PALH.1	10	½	1(p.2)	PBSm	04	03	04
22/05	PALH.2	07	½	2(p.2)	PBSm	04	02	04
22/05	PALH.3	10	½	3(p.2)	PBSm	08	03	06
22/05	PALH.4	06	½	4(p.2)	PBSm	02	00	02
22/05	PALH.5	10	½	5(p.2)	PBSm	05	04	05
22/05	PALH.6	09	½	6(p.2)	PBS m	01	00	01

Obs:1(18Mo/30BI);2(20BI/20BI);3(15Mo/25BI);4(09D/06D);5(14Mo/13Mo);6(35Mo/08BI); 7(03Be+05D).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO I

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:10

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 10

CHEGADA: 03/05/02

ECG: 21/05/02

HCG:23/05/02

PLACAS: 24/05/02

Nº:8

COLETA: 27/05/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 10:15

TÉRMINO: 10:45

LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 10:50

TÉRMINO: 11:12

TOTAL EMBRIÕES: 80

MÓR: 12

BLAST: 68

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool®

CRIOPROTETOR: Glicerol 10%

EQUILÍBRIO (t/min): 10 min.

SEEDING (T/ °C): -7 °C

CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: FIO TEFLON CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

	CONTROLE	FIO TEFLON N°emb./estágio	PALHETA N°emb./estágio	ESTOCAGEM
DATA	N°emb./estágio			
27/05	1-24 20BI + 04Mo			ESTUFA
27/05			1- 10 BI	RAQUE
27/05			2- 07 BI + 3Mo	RAQUE
		1- 10BI		C. INOX
		2- 7BI + 3Mo		C. INOX

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	N° EMB	QUALIDAD E	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
28/05	Estufa	24	½	1	PBSm	24	13	21
31/05	FIO TEF. 1	10	2/3	1	PBSm	01	00	01
31/05	FIO TEF. 2	10	2/3	2	PBSm	01	01	01
31/05	PALH.1	08	½	3	PBSm	02	01	02
31/05	PALH.2	08	½	4	PBSm	03	01	02

Obs: 1(19BI/x); 2(07Mo/x); 3(20BI/35BI); 4(x/x); 5(10D/09Mo); 6(x/12D); 7(x/x); 8(x/x).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO II

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:1

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 15 CHEGADA: 26/07/2002

ECG: 10/08/02 HCG:12/08/02 PLACAS: 13/08/02 Nº: 12

COLETA: 16/08/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 10:30 TÉRMINO: 10:50
LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 11:15 TÉRMINO: 12:00

TOTAL EMBRIÕES: 360 MÓR: 160 BLAST: 200

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool® CRIOPROTETOR: Glicerol 10%
EQUILÍBRIO (t/min): 10 min. SEEDING (T/ °C): -7 °C CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: Eppendorf CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

DATA	CONTROLE	EPPEND.	PALHETA
	Nºemb./estágio	Nºemb./estágio	Nºemb./estágio
16/08	1- 10 BI	1- 20 BI	1- 10 BI
16/08	2- 10 Mo	2- 20 BI	2- 10 BI
16/08		3- 20 BI	3- 10 BI
16/08		4- 20 BI	4- 11 BI
16/08			5- 24 Mo
16/08			6- 20 Mo
16/08			7- 20 Mo
16/08			8- 20 Mo

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	Nº EMB	QUALIDADE	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
17/08	Estufa	10	1	1	KSOM	10	07	09
17/08	Estufa	10	1	2	KSOM	08	08	09
20/08	EPPE.03	15	1	1	KSOM	02	02	02
20/08	EPPE.04	16	1	4	KSOM	03	02	02
20/08	EPPE.01	15	1	3	KSOM	06	03	04
20/08	EPPE.02	14	1	2	KSOM	05	02	03
20/08	PALH.1	10	2	4(p.1)	KSOM	05	03	04
20/08	PALH.2	10	2	3(p.1)	KSOM	03	01	01
20/08	PALH.3	08	2	2(p.3)	KSOM	05	02	03
20/08	PALH.4	11	2	2(p.1)	KSOM	06	02	04
20/08	PALH.5	24	1	1(p.3)	KSOM	13	10	12
20/08	PALH.6	20	1	4(p.3)	KSOM	17	09	14
20/08	PALH.7	19	2	1(p.1)	KSOM	11	06	10
20/08	PALH.8	20	2	3(p.3)	KSOM	17	11	15

Obs: 1(50/30); 2 (x/x); 3 (20/30); 4(10/20); 5(x/x); 6(18/10); 7(x/x); 8 (12/10); 9 (10/20); 10 (45/10); 11(x/x); 12(20/12).

PROCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO II

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:2

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 16 CHEGADA: 5 (09/08/02); 5 (24/05/02); 6 (placas negativas)

ECG: 17/08/02 HCG:19/08/02 PLACAS: 20/08/02 Nº: 11

COLETA: 23/08/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 9:15 TÉRMINO: 9:50

LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 10:30 TÉRMINO: 10:46

TOTAL EMBRIÕES: 160 MÓR: 80 BLAST: 80

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool® CRIOPROTETOR: Glicerol 10%

EQUILÍBRIO (t/min): 10 min. SEEDING (T/ °C): -7 °C CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: Eppendorf CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

DATA	CONTROLE	EPPEND. N°emb./estágio	PALHETA
	N°emb./estágio		N°emb./estágio
23/08	1- 10 BI	1- 20 BI	1- 10 Mo
23/08	2- 10 Mo	2- 20 BI	2- 10 Mo
23/08		3- 20 BI	3- 08 Mo
23/08		4- 20 BI	4- 08 Mo
23/08			5- 10 Mo
23/08			6- 10 Mo
23/08			7- 08 Mo
23/08			8- 07 Mo

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	N° EMB	QUALIDADE	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
27/08	Estufa	10	1	1	KSOM	10	08	09
27/08	Estufa	10	1	2	KSOM	10	08	08
27/08	EPPE. 03	17	2/3	1	KSOM	06	02	03
27/08	EPPE. 04	11	2/3	2	KSOM	03	01	01
27/08	EPPE. 02	15	2/3	3	KSOM	05	02	02
27/08	EPPE.01	18	2/3	4	KSOM	09	04	06
27/08	PALH.1	10	2/3	2(p.1)	KSOM	08	03	06
27/08	PALH.2	10	2/3	1(p.1)	KSOM	07	01	05
27/08	PALH.3	04	2/3	4(p.2)	KSOM	03	02	02
27/08	PALH.4	05	2/3	3(p.2)	KSOM	01	00	01
20/08	PALH.5	10	2/3	4(p.1)	KSOM	10	05	07
20/08	PALH.6	09	2/3	3(p.1)	KSOM	08	03	05
20/08	PALH.7	05	2/3	1(p.2)	KSOM	02	01	02
20/08	PALH.8	06	2/3	2(p.2)	KSOM	01	00	01

Obs: 1(x/x); 2 (x/x); 3 (x/21); 4(30/x); 5(x/x); 6(20/15); 7(x/x); 8 (10/x); 9 (35/20); 10(x/x); 11(10/x).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO II

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:3

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 10

CHEGADA: 16/08/2002

ECG: 25/09/02

HCG:27/09/02

PLACAS: 28/09/02

Nº: 7

COLETA: 1º/10/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 9:44

TÉRMINO: 10:00

LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 10:05

TÉRMINO: 10:17

TOTAL EMBRIÕES: 220

MÓR: 50

BLAST: 168

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool®

CRIOPROTETOR: Glicerol 10%

EQUILÍBRIO (t/min): 10 min.

SEEDING (T/ °C): -7 °C

CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: Eppendorf CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

DATA	CONTROLE	EPPEND. Nºemb./estágio	PALHETA
	Nºemb./estágio		Nºemb./estágio
1º/10	2- 10 Mo	2- 20 BI	1- 10 Mo
1º/10	3- 10 BI	3- 18 BI	2- 10 Mo
1º/10		4- 20 BI	3- 10 Mo
1º/10		5- 20 BI	4- 10 Mo
1º/10		6- 20 BI	5- 10 BI
1º/10		7- 20 BI	6- 10 BI

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	Nº EMB	QUALIDADE	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
02/10	Estufa	10	1	2	KSOM	10	09	09
02/10	Estufa	10	1	3	KSOM	10	09	09
14/10	EPPE.02	17	2/3	4(p.1)	KSOM	03	02	02
14/10	EPPE.03	15	2/3	2(p.1)	KSOM	03	01	03
14/10	EPPE.04	17	2/3	3(p.1)	KSOM	12	10	11
14/10	EPPE.05	18	2/3	6(p.1)	KSOM	07	04	05
14/10	EPPE.06	15	2	5(p.1)	KSOM	03	02	02
14/10	EPPE.07	18	2	7(p.1)	KSOM	08	05	06
14/10	PALH.1	10	2	1(p.2)	KSOM	01	00	00
14/10	PALH.2	09	2	2(p.2)	KSOM	06	03	05
14/10	PALH.3	10	2	4(p.2)	KSOM	07	04	05
14/10	PALH.4	09	2	3(p.2)	KSOM	06	04	04
14/10	PALH.5	10	2	5(p.2)	KSOM	06	02	04
14/10	PALH.6	10	2	6(p.2)	KSOM	04	01	02

Obs: 1(20/25); 2 (15/10); 3 (15/03); 4(30/x); 5(40/40); 6(13/10); 7(x/x).

PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO, COLETA, CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO EXPERIMENTO II

Sabrina Silveira Assaf

ROTINA:4

SUPEROVULAÇÃO:

Nº FÊMEAS: 10

CHEGADA: 16/08/2002

ECG: 02/10/02

HCG:04/10/02

PLACAS: 05/10/02

Nº: 6

COLETA: 08/10/02

LAVAGEM OVIDUTOS - INÍCIO: 9:30

TÉRMINO: 9:48

LAVAGEM EMBRIÕES - INÍCIO: 9:50

TÉRMINO: 10:15

TOTAL EMBRIÕES: 150

MÓR: 90

BLAST: 60

CONGELAÇÃO:

MÉTODO: Biocool®

CRIOPROTETOR: Glicerol 10%

EQUILÍBRIO (t/min): 10 min.

SEEDING (T/ °C): -7 °C

CURVA: 0,3 °C/min.

VITRIFICAÇÃO:

MÉTODO: Eppendorf CRIOPROTETOR: Etileno glicol 50% EQUILÍBRIO: Etileno glicol 10%

TRATAMENTOS

DATA	CONTROLE	EPPEND. Nºemb./estágio	PALHETA
	Nºemb./estágio		Nºemb./estágio
08/10	1- 10 Mo	1- 20 BI	1- 10 Mo
08/10	2- 10 BI	2- 20 BI	2- 10 Mo
08/10		3- 15 BI	3- 10 Mo
08/10			4- 10 Mo
08/10			5- 10 Mo
08/10			6- 10 Mo
08/10			7- 18 Mo

AQUECIMENTO

DATA	ENVASE	Nº EMB	QUALIDADE	GOTA	MEIO	24h	48h	ECLOSÃO
09/10	Estufa	10	1	1	KSOM	10	09	09
09/10	Estufa	10	1	2	KSOM	10	09	09
15/10	EPPE.03	14	2/3	1(p.1)	KSOM	02	02	02
15/10	EPPE.01	16	2/3	2(p.1)	KSOM	08	06	06

15/10	EPPE.02	20	2/3	4(p.1)	KSOM	09	04	06
15/10	PALH.1	10	2/3	6(p.1)	KSOM	07	05	06
15/10	PALH.2	05	2/3	8(p.1)	KSOM	03	01	02
15/10	PALH.3	10	2/3	9(p.1)	KSOM	08	04	08
15/10	PALH.4	07	2/3	10(p.1)	KSOM	01	00	00
15/10	PALH.5	09	2/3	11(p.1)	KSOM	05	02	03
15/10	PALH.6	08	2/3	7(p.1)	KSOM	04	01	04
15/10	PALH.7	14	2/3	5(p.1)	KSOM	08	03	06

Obs: 1(x/x); 2 (14/30); 3 (x/x); 4(18/40); 5(60/40); 6(x/x).