

Vitrificação de embriões *Mus domesticus domesticus* contidos em volumes diferentes de 9,0 M de etileno glicol

Vitrification of *Mus domesticus domesticus* embryos exposed to different volumes of 9.0 M ethylene glycol solution

Sabrina Silveira Assaf,* José Luiz Rodrigues**

Resumo

Os experimentos tiveram como objetivo determinar a taxa de eclosão dos embriões vitrificados em volumes diferentes de 9,0 M de etileno glicol. Simultaneamente, testaram-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 sendo após transferidos para o volume de 1 µL no interior de um fio de *teflon*, medindo 0,4mm de diâmetro, 2,0cm de comprimento e 0,05mm 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 e foram colocados em 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=79,80% (245/307); T2=40,07% (117/292); T3=39,13% (54/138) e T4=25,69% (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 contendo 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), 42,22% (141/334) e 19,82% (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.

Abstract

This work was performed with *Mus domesticus domesticus* embryos to verify the *in vitro* viability of vitrified embryos using different 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, 2cm length and 0.05 mm thickness containing the drop of 1 µL volume, and placed into stainless steel box for the storage in LN₂; treatment 4: 144 embryos were exposed to a dehydration solution (10% éthylene glycol + 6% BSA in PBSm) and after 2 minutes were transferred to the teflon wire, that was previously loaded with 1 µL of the vitrification solution

* Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Unesp – Botucatu

**Professor titular – Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da UFRGS – Caixa Postal 15004 – 91501-970 – Porto Alegre, RS.

Autor para correspondência: José Luiz Rodrigues. E-mail: joseluiz.rodrigues@ufrgs.br

(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 =79,80% (245/307); T2=40,07% (117/292); T3=39,13% (54/138) and T4=25,69% (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=42.22% (141/334) and T3=19.82% (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 embryo vitrification procedure after being exposed to 9.0 M of ethylene glycol-based solution and loaded in eppendorf tubes were not efficient to warrant the embryo's biological security during storage in liquid nitrogen.

Keywords: vitrification, mouse, embryos, load, ethylene glycol.

Introdução

A vitrificação tornou-se uma alternativa para criopreservação de células e de tecidos e, recentemente, seu sucesso tem aumentado as expectativas em diversas áreas de conhecimento envolvidas com a preservação de gametas e embriões. As interações entre a composição bioquímica das células, as soluções crioprotetoras e suas propriedades, estão associadas à presença de polímeros ou açúcares, bem como a outras macromoléculas sintéticas e/ou biológicas, aos métodos de desidratação celular e ao tipo de crioprotetor (Kuleshova et al., 2001). O desafio para se obter êxito na criopreservação de embriões consiste em estabelecer uma adequada seqüência 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 mecanismo da vitrificação é basicamente diferenciado do congelamento por proporcionar a solidificação sem cristalização (Luyet, 1969). Dobrinsky (1996) destaca que ambos os procedimentos de criopreservação tentam minimizar conseqüências como o efeito tóxico do crioprotetor, a elevada concentração de eletrólitos intracelulares, a injúria osmótica, e a fratura da zona pelúcida, além de alterações nas organelas e no citoesqueleto.

Rall e Fahy, em 1985, relataram o primeiro sucesso na 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 obtidas com o 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., 1992).

O emprego de procedimentos que descrevem a imersão dos embriões em nitrogênio líquido acondicionados em envoltórios plásticos de várias formas, diâmetro e espessura (Vajta et al., 1997; Vajta et al., 1998; Lane et al., 1999; Lane e Gardner, 2001), microcapilares (Kong et al., 2000), folhas de papel alumínio (Dinneyes et al., 2000), grades de microscopia

eletrônica (Park et al., 1999), tem proporcionado desenvolvimento embrionário superior ao obtido com as palhetas convencionais de 0,25 mL. A necessidade de um resfriamento cada vez mais rápido, alcançado por meio da redução do volume da solução crioprotetora (menos de 1 µL) ou das modificações na composição e na forma dos recipientes aplicados no envase, procuram viabilizar a aceleração do processo de trocas de calor. 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, por meio da utilização de grades de microscopia eletrônica ou palhetas esticadas (Arav e Zeron, 1997; Vajta et al., 1997; Vajta et al., 1998 e Park et al., 1999) 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 náilon (*nylon loop*) (Lane et al., 1999; 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. 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 (Shaw et al., 1997). Mesmo nestas combinações, a base da solução mais comumente utilizada ainda consiste de altas concentrações (a partir de 30%) de crioprotetores permeáveis.

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.

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 seis e oito semanas e os machos entre dois e dez meses.

A superovulação das fêmeas foi induzida por meio da aplicação de 10 UI (0,1 mL) de eCG via intraperitoneal, seguida da aplicação de 10 UI (0,1 mL) de hCG 48 horas após (Rafferty, 1990). Após a aplicação do hCG, as fêmeas foram colocadas nas caixas individuais dos machos para o acasalamento, na proporção de duas 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)). Os embriões eram examinados com o auxílio de estereomicroscópio 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 dois 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. Após 10 minutos realizou-se, com auxílio de uma pinça metálica, a indução manual da cristalização (*seeding*), e decorridos 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% permanecendo durante 3 minutos em cada solução 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 mantidos 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 0,4mm de diâmetro, 2cm de comprimento e 0,05mm de espessura de parede. Os embriões foram vitrificados em temperatura ambiente 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.

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 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 0,1mL, os embriões eram expelidos do interior do fio de *teflon* e imediatamente lavados em gotas de PBSm acrescido de 0,4% de BSA e cultivados em gotas de 80 µL do mesmo meio em estufa (Forma Scientific®) a 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 0,5cm de diâmetro, 3cm de altura e 0,5mm 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).

Primeiramente, os embriões permaneciam 2 minutos na SD, após eram transferidos com auxílio de uma pipeta de vidro acoplada a um controlador bucal preenchido com a solução de vitrificação para o interior dos tubos eppendorf com volume aproximado de 3 µL.

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

Para a desvitrificação dos embriões, foram utilizadas duas soluções de sacarose com concentrações de 1,0 M (S₁) e 0,5 M (S₂). 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 e após a recuperação dos embriões, estes eram transferidos para solução S₂ onde permaneciam 3 minutos, antes de serem lavados em solução de PBSm acrescida de 0,4% de BSA. Após a lavagem, os embriões eram cultivados em 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.

Resultados

No experimento I, os resultados de viabilidade embrionária (Tabela 1) revelaram diferença significativa entre os tratamentos, independentemente do estágio de desenvolvimento embrionário ser a expansão ou a eclosão. Quanto à capacidade de eclosão embrionária observada após o aquecimento dos embriões, o tratamento controle foi superior aos demais (T1 =79,80%). Os embriões submetidos à vitrificação com estocagem em caixa de aço inoxidável não apresentaram diferença significativa dos embriões congelados pelo método rápido (T2=40,07% e T3=39,13%). O tipo de estocagem não teve efeito significativo sobre as

taxas de sobrevivência embrionária após a vitrificação (T3=39,13% e T4=25,69%).

Tabela 1: 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	98,05 ^a	245	79,80 ^a	
Congelamento Rápido	292	145	49,67 ^b	117	40,07 ^b	
Vitrificação Caixa inox.	138	61	44,21 ^{bc}	54	39,13 ^{bc}	
Vitrificação (Globete/raque)	144	41	28,47 ^c	37	25,69 ^c	

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

*10 replicações.

No experimento II, houve diferença significativa entre os três tratamentos (Tabela 2). 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=42,22%), apresentaram desenvolvimento embrionário superior aos vitrificados em tubo eppendorf (T3=19,82%).

Tabela 2: Taxas de expansão e eclosão após aquecimento e cultivo *in vitro* de embriões *Mus domesticus domesticus* vitrificados e envasados em tubos eppendorf

Tratamentos	Embriões		Expansão		Eclosão	
	n	n	(%)	n	(%)	
Controle	80	78	97,50 ^a	71	88,75 ^a	
Congelamento Rápido	334	183	54,79 ^b	141	42,22 ^b	
Vitrificação	333	93	27,93 ^c	66	19,82 ^c	

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

*4 replicações.

Discussão

Os diferentes volumes de 9,0 M de EG utilizados nestes experimentos foram obtidos por meio do envase dos embriões em fios de *teflon* (volume= 1 µL) ou tubos eppendorf (volume= 3 µL). Dentre as características do etileno-glicol está o seu baixo peso molecular, que facilita sua rápida permeação para o interior das células durante um curto período de exposição. Experimentos realizados por Cortês e Rodrigues (2000) mostraram que a exposição dos embriões a concentrações maiores de etileno-glicol, não causa efeitos tóxicos que venham a comprometer a viabilidade embrionária. O teste de toxicidade consistiu na exposição de embriões de camundongo à solução de 9,0 M de EG seguida pelo 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) demonstraram por meio 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. Os autores verificaram que, 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, testaram-se duas formas distintas de estocagem em nitrogênio líquido. Com esta finalidade, foi adotado no T3 um método de estocagem dos fios de *teflon* em caixa de aço inoxidável, proporcionando 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 canister, 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, contribui 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 por microrganismos 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.

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 por meio 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 à 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.

Referências

- AGUIAR, P.R.L.; BERTOLINI, M.; LOPES, R.F.F.; RODRIGUES, J.L. Vitrificação 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. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is affected by the composition and concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology*, v. 47, p. 341, 1997.
- CORTÊS, P.C.G.; RODRIGUES, J.L. Sobrevivência de blastocistos *Mus domesticus domesticus* vitrificados em meio contendo 9,0 M de etilenoglicol 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 vitrified recipient oocytes in cattle. *Theriogenology*, v. 53, p. 215, 2000.
- DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, v. 45, p. 17-26, 1996.
- DULBECCO, R.; VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis 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.
- 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, 1992.
- 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.; 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.
- LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, O.K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryolop container-less technique. *Fertility and Sterility*, v. 72, p. 1073-1078, 1999.
- LANE, M.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Molecular Reproduction and Development*, v. 58, p. 342-347, 2001.
- 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.
- PARK, P. S.; KIM, Y.E.; KIM, I.O.; PARK, H.N.; WON, S.Y.; YOON, H.S.; CHUNG, S. K.; UM, H.J. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Human Reproduction*, v. 14, p. 2838-2843, 1999.
- RAFFERTY, Jr. K. A. *Methods in experimental embryology of the mouse*. 1. ed. Baltimore and London: Johns & Hopkins, 1990.
- RALL, W.F.; FAHY, G. M. Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C. *Nature*, v. 313, p. 573-575, 1985.
- SHAW, J.M.; KULESHOVA, L.L.; MCFARLANE, D.R.; TROUNSON, A.O. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, ficoll or dextran. *Cryobiology*, v. 35, p. 219-229, 1997.
- STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de embriões*. 3. ed. Champaign: IETS, 1999.
- 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.
- WHITTINGHAM, D. G. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert.*, Suppl. 14, p. 7-21, 1971.
- WOLFE, J.; BRYANT G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, v. 39, p. 103-129, 1999.