



## Vitrificação de espermatozoides em pequenos ruminantes

### *Small ruminant sperm vitrification*

Márcio Calixto Matias, Maria Monielly da Silva Melo, Melissa de Souza Borges Mendonça, Cícero William César de Sousa, Luiz Fernandes Costa Neto, Diogo Ribeiro Câmara<sup>‡</sup>

Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, AL, Brasil.

#### Resumo

A vitrificação é uma alternativa viável ao método de criopreservação clássica e consiste na utilização de altas concentrações de agente crioprotetores e rápida congelamento, tendo como principal vantagem a não formação de cristais de gelo. Esta técnica é acessível por apresentar facilidade, rapidez e baixo custo para sua produção, não necessitando de grandes equipamentos, apresentando-se com grande potencial a ser explorado. Portanto, objetivou-se com esta revisão descrever as principais características da vitrificação, bem como os resultados obtidos com sêmen de em caprinos e ovinos e as perspectivas para a utilização desta técnica.

**Palavras-chave:** congelamento ultrarrápido, criopreservação, espermatozoides, gema de ovo, sacarose

#### Abstract

*Vitrification is a viable alternative to the classical cryopreservation method and consists in the use of high concentrations of cryoprotectants and fast freezing, having as the main advantage the absence of ice crystals formation. The feasibility of this technique is related to be easy, fast and with low cost of execution, since no expensive equipment is needed, presenting a high potential for investigation. Therefore, the objective of this review was to describe the characteristics of vitrification, as well as the results obtained with sheep and goat semen, and the perspectives for the adoption of this technique.*

**Keywords:** cryopreservation, egg yolk, spermatozoa, sucrose, ultrafast freezing.

#### Introdução

A criopreservação das células espermáticas é uma biotecnologia que proporciona o armazenamento e transporte de material genético viável por tempo indeterminado (Pegg, 2002). Atualmente, os melhores resultados obtidos com sêmen de pequenos ruminantes foram através da criopreservação lenta/clássica, no entanto esta técnica apresenta certas limitações (Bittencourt et al., 2013), trazendo também um custo relativamente alto devido a necessidade de equipamentos para sua realização. Diante desta dificuldade, novos métodos surgem na tentativa de obter resultados satisfatórios utilizando técnicas mais rápidas e de baixo custo, capazes de manter a viabilidade de um alto percentual de células espermáticas após a criopreservação, sendo a vitrificação uma das técnicas mais promissoras.

A vitrificação é uma técnica de criopreservação caracterizada pela exposição do material a ser vitrificado ao contato direto com o nitrogênio líquido, utilizando altas concentrações de agentes crioprotetores (ACP) e curvas de congelamento ultra rápidas, com quedas de temperaturas superiores a 10.000°C/min (Carvalho et al., 2011). Estas características, aliadas a alta osmolaridade dos crioprotetores externos, fazem com que as células espermáticas desidratem de forma rápida, proporcionando a mudança do estado líquido para o estado amorfo da matéria. Nesse estado, por conta da sua alta viscosidade, o fluido que permanece no espaço intracelular adquire uma característica vítrea, sem estrutura atômica definida, impedindo a formação de cristais de gelo e acomodando-se bem entre as organelas celulares (Vizuet et al., 2014).

Esta técnica tem sido bem aplicada à embriões e oócito de várias espécies (Dominguez et al., 2013), já sua utilização para criopreservar sêmen encontra-se bem estabelecida em humanos (Slabbert et al., 2015) e, experimentalmente, apresenta bons resultados em algumas espécies (Rosato e Iaffaldano, 2013; Vizuet et al., 2014; Caturla-Sánchez et al., 2018; Pradié et al., 2018). Portanto, objetivo desta revisão é apresentar diferentes técnicas de vitrificação, bem como os principais resultados obtidos com sêmen e suas perspectivas para a utilização desta técnica em caprinos e ovinos.

#### Histórico da vitrificação

O primeiro relato de vitrificação de sêmen foi descrito por Luyet e Hodapp (1938), que obtiveram bons resultados utilizando sacarose como crioprotetor para vitrificar sêmen de sapo. Desde então, diversos trabalhos demonstraram resultados promissores para a vitrificação de sêmen em peixes (Zilli et al., 2018), felídeos (Swanson et al., 2017), cães (Sánchez et al., 2011), humanos (Agha-Rahimi et al., 2016), asininos (Diaz-Jiménez et al., 2018), ovinos (Pradié et al., 2017) e caprinos (Pradié et al., 2018).

<sup>‡</sup>Correspondência: diogo@vicosa.ufal.br

Recebido: 27 de dezembro de 2018

Aceito: 22 de março de 2019



A vitrificação apresenta como vantagem a velocidade do processamento das amostras e a não necessidade de equipamentos sofisticados para a criopreservação das amostras, o que pode reduzir os custos do processamento. Além disso, o estresse osmótico que ocorre durante a realização do processo de congelamento clássico, em virtude da formação de cristais de gelo extracelulares, é um dos principais responsáveis por danos celulares irreversíveis durante a criopreservação (Sieme et al., 2016). Especificamente em relação a criopreservação espermática utilizando a técnica de vitrificação, é importante lembrar que esse processo envolve a utilização de soluções com alta osmolaridade associadas a curvas de congelamento extremamente rápidas e, ao contrário do que é geralmente aceito, as lesões espermática quando da utilização de curvas rápidas de refrigeração/congelamento/vitrificação podem ser consequência do desequilíbrio osmótico entre o meio extra e intracelular durante o reaquecimento, e não devido a formação de cristais de gelo intracelulares (Morris et al., 2012; Sieme et al., 2016). Essa informação é de grande relevância, considerando a variação na tolerância osmótica que espermatozoides de diferentes espécies apresentam (Benson et al., 2012).

Uma das principais barreiras a serem vencidas para obter-se sucesso com a vitrificação é minimizar os efeitos tóxicos dos crioprotetores. Inicialmente, era preconizado a utilização de grandes quantidades de ACP com uma velocidade de congelamento relativamente baixa. A concentração total de ACP tinha que ser no mínimo 50% do total da amostra para obter-se pressão atmosférica necessária para vitrificação estável (Isachenko et al., 2003). Visto que não é possível aplicar essa metodologia para vitrificar espermatozoides, novas formas foram desenvolvidas afim de obter melhores resultados reduzindo a concentração de ACP.

Segundo Isachenko et al. (2003) para ocorrer a vitrificação é necessário o equilíbrio entre a quantidade ACP e a taxa de congelamento, sendo essas variáveis inversamente proporcionais. Em outras palavras, quanto maior a concentração de ACP, menor será a velocidade de resfriamento necessário para vitrificar a amostra. Em contrapartida, quanto menor a concentração de ACP, maior será a velocidade de resfriamento necessária para vitrificar a amostra, sendo esta a alternativa mais viável encontrada para vitrificar espermatozoides, visto que as altas concentrações de ACP apresentam toxicidade aos espermatozoides (Fahy et al., 1984).

Após diversas pesquisas mostrarem resultados promissores em diversas espécies com a utilização de sacarose em baixas concentrações, na espécie ovina ainda se busca determinar a quantidade ideal de crioprotetores extracelulares e intracelulares, de forma isolada ou associada. Inicialmente, Jiménez-Rabadán et al. (2015) investigaram a toxicidade da sacarose e do glicerol, com base em diferentes concentrações (sacarose a 0,03 M, 0,05 M, 0,15 M e 0,25 M; e glicerol a 3%, 7%, 14% e 18%) em comparação a extensor comercial (Biladyl<sup>®</sup> com 20% de gema de ovo e 7% de glicerol). Os seus resultados mostram que ambos crioprotetores apresentaram toxicidade, no entanto, foi observado que seu efeito tóxico era mais brando em baixas concentrações. Posteriormente a vitrificação foi realizada com combinações de sacarose e glicerol (sacarose a 0,03 e 0,05 M com 3% e 7% de glicerol, respectivamente) e comparada com a criopreservação clássica utilizando o mesmo diluente a base de Biladyl<sup>®</sup>. O resultado da vitrificação foi significativamente inferior a criopreservação clássica, entretanto foi observado que a gema de ovo trouxe resultados benéficos. O efeito benéfico da utilização da sacarose em pequenas concentrações vai ao encontro dos relatos de outros autores (Arando et al., 2017; Pradieé et al., 2018; Bóveda et al., 2018).

Já em caprinos, tem-se obtidos bons resultados com a técnica de vitrificação (Bóveda et al., 2018; Daramola et al., 2016; Pradieé et al., 2018). O primeiro relato publicado foi descrito por Pradieé et al., (2015) utilizando sêmen de *Iberian ibex*. De forma similar ao relatado em ovinos, foi observado que os crioprotetores permeáveis (glicerol e DMSO) apresentavam efeito tóxico para os espermatozoides. No entanto em seu experimento ao utilizar TRIS, ácido cítrico, glicose (TCG) + gema de ovo como diluente e com adição de sacarose em diferentes concentrações (100mM, 200mM e 300mM) os melhores resultados foram obtidos quando da utilização de menores concentrações de sacarose.

### Técnicas de vitrificação

Diversas técnicas de vitrificação tem sido descritas, tendo suas variações em função da redução da quantidade de ACP, curva de temperatura utilizada, superfície de contato da célula/tecido com o nitrogênio líquido e nas diferentes estratégias utilizadas para o armazenamento das amostras. Dentre os métodos que usam palhetas, pode-se mencionar: a vitrificação convencional em palhetas de 0,25 ml (Cetin e Bastan, 2006), palhetas alongadas (Chen et al., 2001), palhetas abertas (El-Gayar e Holtz, 2001); pipetas de desnudamento flexipet (Liebermann et al., 2002) e pipetas Cryotop (Mizuno et al., 2018). Estudos iniciais desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa tem demonstrado uma baixa toxicidade dos meios de vitrificação à base de sacarose, sem adição de crioprotetora permeáveis, aos sêmen ovino e um efeito benéfico da gema de ovo. Todavia, os resultados observados pós-reaquecimento das amostras ainda resultam em qualidade espermática inferior à criopreservação clássica. Estratégias de associação com crioprotetores penetrantes ou que permitam o aumento da viscosidade do meio estão sendo adotadas para avaliar sua influência sobre a qualidade das amostras pós-reaquecimento (dados não publicados).

Com a utilização de criotubos, estão descritos os métodos de vitrificação por cobertura direta (Chen et al., 2006) e Cryoloop (Lane et al., 1999; Succu et al., 2007). Existe ainda métodos de vitrificação em superfície sólida (Xing et al., 2010; Kamath et al., 2011) e espátula (Tsang e Chow, 2009). Atualmente, os principais métodos utilizados para vitrificação de sêmen são em palhetas e gotas, tendo estes diversas variações, principalmente



relacionadas ao seu volume e diâmetro.

O volume da gota é um dos fatores que sofrem ação direta do nitrogênio, uma vez que as células espermáticas da superfície da gota vitrificam em uma curva mais rápida que as células do interior da gota ao entrar em contato com o nitrogênio líquido. Teoricamente, quanto menor a gota, melhores os resultados. Este efeito foi demonstrado por Diaz-Jimenez et al., (2018) que ao vitrificarem sêmen de asinino relataram ter melhores resultados em palhetas com pouco volume do que em gotas. Contudo, para vitrificação de sêmen, o método de gotas ou esferas está sendo mais utilizado por apresentar facilidade na técnica e ter bons resultados (Isachenko et al., 2003; Merino et al., 2011).

Do ponto de vista biofísico, o tamanho da gota interfere diretamente com a perda de calor observado no momento do contato da gota com o nitrogênio líquido. Quando isso ocorre, a gota de sêmen salta diversas vezes sobre a superfície antes de imergir completamente no nitrogênio, sendo esse fenômeno de perda de calor, conhecido como efeito Leidenfrost, e foi demonstrado por Feng et al. (2018) que quanto maior a concentração de crioprotetores, mais evidente é a presença deste efeito.

### **Crioprotetores, aditivos e fatores que influenciam à vitrificação**

Desde o primeiro relato de vitrificação descrito por Luyet e Hodapp (1938), a sacarose vem sendo comumente utilizada em experimento para vitrificar sêmen, obtendo sucesso e bons resultado em diversas espécies. Em ovinos ela apresentou efeito benéfico, no entanto, os melhores resultados só foram observado quando houve a presença da gema de ovo como base nos extensores utilizados para vitrificação.

Ao avaliar o efeito da sacarose em espermatozoides de ovinos com diversas concentrações (0,4 M, 0,6 M e 0,8 M) e com diferentes temperaturas de estabilização (22°C e 5°C), utilizando TRIS, ácido cítrico, frutose e gema de ovo (20%) como diluidor, Arando et al. (2017) notaram que os parâmetros espermáticos melhoravam proporcionalmente a redução das concentrações de sacarose, e que quando a mesma é utilizada como crioprotetor o tempo de estabilização à 5°C trouxe um efeito benéfico aos parâmetros espermáticos, quando comparado a temperatura ambiente (22°C). Resultado semelhante foi descrito por Gao et al. (1993) que ao expor espermatozoides a soluções hiperosmóticas (semelhantes às usadas na vitrificação) observou que em baixas temperaturas as células sofrem menor taxa de lise.

Utilizando sêmen de carneiros da raça Muflon (*Ovis ammon musimon*), Pradié et al. (2018) avaliaram diferentes temperaturas de descongelamento (60°C e 37°C) utilizando tris, ácido cítrico, glicose (TCG), 6% gema de ovo e 100 mM sacarose. Em seus resultados, puderam observar que a temperatura de descongelamento a 60°C aumentou a motilidade espermática total de maneira significativa quando comparada a 37°C (12% vs 6,5%) respectivamente. O mesmo aconteceu para os espermatozoides com acrossoma intacto (7% vs 3%), resultados semelhantes aos encontrados em humanos (Mansilla et al., 2016) e caprinos (Pradié et al., 2015). Isso reforça que para alguns parâmetros como a motilidade total (MT) a temperatura de desvitrificação/descongelamento é um elemento crítico a ser considerando (Mazur e Seki, 2011).

Recentemente foram obtidas boas taxas de motilidade e viabilidade espermática utilizando a vitrificação de sêmen coletado do epidídimo de carneiros da raça *Muflon*, o experimento foi conduzido por Bóveda et al., (2018), que comparou o método de criopreservação clássica utilizando como diluente TRIS, ácido cítrico, glicose (TCG) + 12% de gema de ovo e 5% de glicerol, com o método de vitrificação utilizando TRIS, ácido cítrico, glicose (TCG) + 6% de gema de ovo e 100mM de sacarose. Em seus resultados não houve diferença significativa entre criopreservação clássica e a vitrificação para os principais parâmetros espermáticos, estando entre eles, respectivamente, a motilidade total, viabilidade espermática com (eosina-nigrosina) e anormalidades morfológicas, havendo superioridade quando do uso do método clássico nos parâmetros de motilidade progressiva e teste hiposmótico. Tais valores representam um avanço significativo para técnica de vitrificação, pois os seus parâmetros se assemelham aos da criopreservação clássica, estando dentro dos padrões recomendados para inseminação artificial com sêmen congelado nesta espécie CBRA (2013).

A adição da gema de ovo como crioprotetor trouxe efeito benéfico na maiorias dos trabalhos publicados (Jiménez-Rabadán et al., 2015; Bóveda et al., 2018). Todavia, por ser uma substância não definida e susceptível a alterações em sua constituição, a sua utilização pode apresentar variabilidade nos resultados de diluentes que a utilizam como constituinte, isso é demonstrado por Nalley e Arifiantini (2011), que obtiveram melhores resultados de congelabilidade com sêmen ovino utilizando gema de ovo de galinha suplementadas com ômega-3 quando comparado às não suplementadas. Outra possibilidade é a utilização de emulsificantes em diluentes a base de gema de ovo, seu efeito aumenta a disponibilidade de fosfolipídios da gema de ovo, potencializando sua capacidade crioprotetora (Rota et al., 1999; Maia et al., 2005).

Vários aditivos tem sido testados visando uma melhor resposta de células e tecidos ao processo de criopreservação. A prolina, por exemplo, é considerada um osmoprotetor e antioxidante, sendo elencada como crioprotetor natural devido a sua alta solubilidade, pH neutro e ausência de toxicidade mesmo em altas concentrações aos meios de vitrificação, tendo melhorado os resultados de vitrificação de oócitos de camundongos (Zhang et al., 2016). A adição de prolina também foi capaz de aumentar a motilidade pós-descongelamento de espermatozoides de ovinos criopreservados pelo método clássico (Sánchez-Partida et al., 1998).

Em humanos a adição de progesterona aumentou motilidade de amostras de sêmen vitrificadas, bem como,



os parâmetros de velocidade (VAP), (VLC) e (ALH) para as amostras congeladas (Saymé et al., 2018). Neste estudo foi demonstrado que a adição de 50 mM de progesterona incubada por 1 hora após o reaquecimento e/ou descongelação, incrementaram os parâmetros de cinética espermática das amostras. Os autores acreditam que receptores presentes na membrana espermática são influenciados pela progesterona e esse efeito de hiperatividade nas células espermáticas já havia sido demonstrado por Lishko et al. (2011).

Outro fator a ser estudado é a utilização de antioxidantes na vitriificação do sêmen. Existem diversos trabalhos que mostram a eficácia da sua utilização no método de criopreservação clássica (Agarwal et al., 2012), contudo não há relatos da utilização de antioxidantes na vitriificação de sêmen ovino. Em caprinos, Daramola et al. (2016) observaram que a adição de leite de coco e vitamina B6 nos extensores de vitriificação diminuíram de forma significativa as concentrações de malondialdeído e melhoraram os parâmetros de viabilidade do sêmen de caprinos. Nesse estudo foi demonstrado os efeitos benéficos dos antioxidantes do leite de coco e da vitamina B6, no entanto os melhores resultados só foram obtidos nas concentrações máximas estudadas (20% e 8mM) respectivamente.

Um estudo recente demonstrou que a adição da vitamina C atenuou efeitos deletérios do sêmen humano vitriificado (Mangoli et al., 2018), neste trabalho foi observado a diminuição dos valores de quase todas as variáveis deletérias ao sêmen, como justificativa os autores relatam que a vitamina C supre a demanda de antioxidantes que é necessária para impedir o aumento de espécies reativas ao oxigênio (ROS), já que no processo de vitriificação é necessário a retirada do plasma seminal.

### Considerações finais

A vitriificação de sêmen é uma técnica relativamente nova, promissora e que apresenta bons resultados em diversas espécies, necessitando de estudos mais profundos para sua adoção em pequenos ruminantes. Os principais pontos para o sucesso da técnica estão relacionados à concentração espermática utilizada na amostra, na utilização de diferentes carboidratos como crioprotetores, bem como suas concentrações e associações, à diferentes temperaturas de descongelação, aos aditivos e concentrações de gema de ovo.

### Referências

- Agarwal A, Durairajanayagam D, Plessis SS.** Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod Biol Endocrinol*, v.12, n.112, 19p.
- Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nottola SA, Miglietta S, Moradi A.** Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in new artificial seminal fluid. *Andrology*, v.4, n.6, p.1037-1044, 2016.
- Arando A, Gonzalez A, Delgado JV, Arrebola FA, Perez-Marin CC.** Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Anim Reprod Sci*, v.181, p.175-185, 2017.
- Benson JD, Woods EJ, Walters EM, Critser JK.** The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, v.78, p.1682-1689, 2012.
- Bittencourt RF, Oba E, Ribeiro Filho AL, Chalhoub M, Azevedo HC, Bicudo SD.** Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. *Ciênc Anim Bras*, v.14, n.4, p.522-536, 2013.
- Bóveda P, Estes MC, Castaño C, Toledano-Dizaz A, López-Sebastian A, Muniz A, Prieto P, Mejía O, Ungerfeld R, Santiago-Moreno J.** Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving Mouflon (*Ovis Musimon*) and fallow deer (*Dama Dama*) epididymal Sperm. *Anim Reprod Sci*, v.192, p.193-199, 2018.
- Carvalho AA, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Costa APR.** Vitriificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Veterinaria Brasilica*, p.14, 2011.
- Caturla-Sánchez E, Sánchez-Calabuig MJ, Pérez-Gutiérrez JF, Cerdeira J, Castaño C, Santiago-Moreno J.** Vitrification of dog spermatozoa: effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Cryobiology*, v.80, p.126-129, 2018.
- CBRA.** Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2. Ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.
- Cetin Y, Bastan A.** Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. *Anim Reprod Sci*, v.92, n.1-2, p. 29-36, 2006.
- Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS.** Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod*, v.16, n.11, p.2350-2356, 2001.
- Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW, Yang YS.** Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod*, v.21, n.11, p.2794-2800, 2006.
- Daramola JO, Adekunle EO, Iyasere OS, Oke OE, Sorongbe TA, Iyanda OA, Kehinde AR, Aluko SP, Olaoye IO, Gbadebo OE, Falolu LI, Olukayode EO, Ajayi RA, Enikannaye OJ, Osunjaiye ED.** Effects of coconut milk alone or supplementation with pyridoxine in tris-extenders on viability of buck spermatozoa during vitrification. *Small Rumin Res*, v.136, p.208-213, 2016.
- Diaz-Jimenez M, Dorado J, Pereira B, Ortiz I, Consuegra C, Bottrel M, Ortiz E, Hidalgo M.** Vitrification in



- straws conserves motility features better than spheres in donkey sperm. *Reprod Domest Anim*, v.53, p.56-58, 2018.
- Dominguez F, Castello D, Remohi J, Simón C, Cobo A.** Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. *Fertil Steril*, v.99, n.2, p.565-572.e3, 2013.
- El-Gayar M, Holtz, W.** Technical note: vitrification of goat embryos by the Open Pulled-Straw method. *J Anim Sci*, v.79, n.9, p.2436, 2001.
- Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Maryman HT.** Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, v.21, n.4, p.407-426, 1984.
- Feng H, Xu Y, Yang T.** Study on Leidenfrost effect of cryoprotectant droplets on liquid nitrogen with IR imaging technology and non-isothermal crystallization kinetics model. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, v.127, p.413-421, 2018.
- Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK.** Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod*, v.49, n.1, p.112-123, 1993.
- Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S, Nawroth F.** Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online*, v.6, n.2, p.191-200, 2003.
- Jiménez-Rabadán P, García-Álvarez O, Vidal A, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Ramón M, del Omo E, Fernández-Santos R, Garde JJ, Soler AJ.** Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, v.71, n.1, p.85-90, 2015.
- Kamath MS, Mangalaraj AM, Muthukumar K, Cullinan R, Aleyamma T, George K.** Blastocyst cryopreservation using solid surface vitrification: a preliminary study. *J Hum Reprod Sci*, v.4, n.3, p.114-120, 2011.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK.** Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel Cryoloop container-less technique. *Fertil Steril*, v.72, n.6, p.1073-1078, 1999.
- Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Levy MJ.** Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reproductive BioMedicine Online*, v.4, n.2, p.146-150, 2002.
- Lishko PV, Botchkina IL, Kirichok Y.** Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature*, v.471, p.387-391, 2011.
- Luyet BJ, Hodapp EL.** Revival of Frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Exp Biol Med*, v.39, n.3, p.433-434, 1938.
- Maia MS, Azevedo HC, Bicudo SD, Sousa DB, Rodello L.** Efeito da adição do Equex-STM ao diluente TRIS-gema na motilidade do espermatozoide criopreservado de carneiro. *Acta Sci Vet*, v.33, supl.1, p.311-311, 2005.
- Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Taheri F, Vatanparast M, Rahiminia T, Hosseini A.** Vitamin C attenuates negative effects of vitrification on sperm parameters, chromatin quality, apoptosis and acrosome reaction in neat and prepared normozoospermic samples. *Taiwan J Obstet Gynecol*, v.57, n.2, p.200-204, 2018.
- Mansilla MA, Merino O, Risópatron J, Isachenko V, Isachenko E, Sánchez R.** High temperature is essential for preserved human sperm function during the devitrification process. *Andrologia*, v.48, n.1, p.111-113, 2016.
- Mazur P, Seki S.** Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to 70,000°C/min and warmed at 610° to 118,000°C/min: a new paradigm for cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*, v.62, n.1, p.1-7, 2011.
- Merino O, Risópatron J, Sánchez R, Isachenko E, Figueroa E, Valdebenito I, Isachenko V.** Fish (*Oncorhynchus Mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Anim Reprod Sci*, v.124, n.1-2, p.125-131, 2011.
- Mizuno S, Yamato A, Matsumoto H, Fukuda A, Morimoto Y.** Clinical performance and newborn data of a newly developed closed vitrification device, Cryotop CL, for human embryo vitrification. *Fertil Steril*, v.110, n.4, p.e227, 2018.
- Morris GJ, Acton E, Murray BJ, Fonseca F.** Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology*, v.64, p.71-80, 2012.
- Nalley W, Arifiantini R.** The Viability of local ram semen in Tris buffer with three different egg yolks. *Anim Prod*, v.13, n.1, p.39-44, 2011.
- Pegg DE.** The history and principles of cryopreservation. *Seminars in Reproductive Medicine*, v.20, n.1, p.5-14, 2002.
- Pradice J, Estes MC, Lopez-Sebastián A, Toledano-Díaz A, Castaño C, Carrizosa JÁ, Urrutia B, Santiago-Moreno J.** Successful ultrarapid cryopreservation of wild Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) spermatozoa. *Theriogenology*, v.84, n.9, p.1513-1522, 2015.
- Pradice J, Estes MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Lopez-Sebastián A, Guerra R, Santiago-Moreno J.** Conventional slow freezing cryopreserves Mouflon spermatozoa better than vitrification. *Andrologia*, v.49, n.3, p.e12629, 2017.
- Pradice J, Sánchez-Calabuig MJ, Castaño C, O'Brien E, Estes MC, Beltrán-Breña P, Santiago-Moreno J, Rizo D.** Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian Ibex (*Capra Pyrenaica*). *Theriogenology*, v.108, p.314-320, 2018.
- Rota A, Iguer-Quada M, Verstegen J, Linde-Forsberg C.** Fertility after vaginal or uterine deposition of dog



- semen frozen in a TRIS extender with or without Equex STM Paste. *Theriogenology*, v.51, n.6, p.1045-58, 1999.
- Rosato MP, Iaffaldano N.** Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, v.79, n.3, p. 508-516, 2013.
- Saymé N, Dite L, Krebs T, Kljajic M, Maas DHA.** Positive Effect of progesterone on motility and velocity of fresh, vitrified without permeable cryoprotectants and frozen with permeable cryoprotectants human spermatozoa. *Andrologia*, v.50, n.10, p.e13133, 2018.
- Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF.** Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci*, v.169, p.2-5, 2016.
- Sánchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell WMC.** Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reprod Fertil Dev*, v.10, n.4, p.347, 1998.
- Sánchez R, Risopatrón J, Schulz M, Villegas J, Isachenko V, Kreinberg R, Isachenko E.** Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function: vitrification and dog sperm physiology. *Andrologia*, v.43, n.4, p. 233-241, 2011.
- Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF.** Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci*, v.169, p.2-5, 2016.
- Slabbert M, Du Plessis SS, Huyser C.** Large volume cryoprotectant-free vitrification: an alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia*, v.47, n.5, p. 594-599, 2015.
- Succu S, Leoni GG, Berlinguer F, Madeddu M, Bebbere D, Mossa F, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S.** Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. *Theriogenology*, v.68, n.1, p. 107-114, 2007.
- Swanson W, Bateman H, Vansandt L.** Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reprod Domest Anim*, v.52, p.255-260, 2017.
- Tsang WH, Chow KL.** Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *BioTechniques*, v.46, n.7, p.550-552, 2009.
- Vizueté G, Jiménez E, Agüera EI, Pérez-Marin CC.** Impact of ultra-rapid freezing on the motility, morphology, viability and acrosome integrity of epididymal cat sperm diluted in sucrose-based extenders. *Reprod Domest Anim*, v.49, n.1, p.e5-e8, 2014.
- Xing W, Zhou C, Bian J, Montag M, Xu Y, Li Y, Li T.** Solid-Surface Vitrification is an appropriate and convenient method for cryopreservation of isolated rat follicles. *Reprod Biol Endocrinol*, v.8, n.42, 2010.
- Zhang L, Xue X, Yan J, Yan LY, Jin XH, Zhu XH, He ZZ, Liu J, Li R, Qiao J.** L-Proline: A highly effective cryoprotectant for mouse oocyte vitrification. *Sci Rep*, v.6, n.1, 2016
- Zilli L, Bianchi A, Sabbagh M, Pecoraro L, Schiavone R, Vilella S.** Development of Sea Bream (*Sparus Aurata*) semen vitrification protocols. *Theriogenology*, v.110, p.103-109, 2018.
-