

**PAULA FERNANDA BARBOSA DE ARAÚJO LEMOS**

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES CAPRINOS E OVINOS  
PRODUZIDOS *in vivo* APÓS CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZANDO  
ETILENOGLICOL, DIMETILSULFÓXIDO E  
DIMETILFORMAMIDA**

**Recife/PE  
Fevereiro - 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**PAULA FERNANDA BARBOSA DE ARAÚJO LEMOS**

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES CAPRINOS E OVINOS  
PRODUZIDOS *in vivo* APÓS CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZANDO  
ETILENOGLICOL, DIMETILSULFÓXIDO E  
DIMETILFORMAMIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira

**Recife/PE  
Fevereiro - 2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES CAPRINOS E OVINOS PRODUZIDOS *in vivo*  
APÓS CRIOPRESERVAÇÃO UTILIZANDO ETILENOGLICOL,  
DIMETILSULFÓXIDO E DIMETILFORMAMIDA**

Tese de Doutorado elaborada por

**PAULA FERNANDA BARBOSA DE ARAÚJO LEMOS**

Aprovada em 25/02/2010

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. MARCOS ANTÔNIO LEMOS DE OLIVEIRA  
Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

---

Prof. Dr. VICENTE JOSÉ FIGUEIRÊDO FREITAS  
Membro da banca

---

Prof. Dr. PAULO FERNANDES DE LIMA  
Membro da banca

---

Prof. Dr. ADAUTO CHIAMENTI  
Membro da banca

---

Dr. SEBASTIÃO INOCÊNCIO GUIDO  
Membro da banca

*Aos meus filhos, Maria Fernanda e João Pedro,*

Pelo imenso amor que representam em minha vida, a maior razão da minha caminhada. Que mesmo nos meus momentos de cansaço, tristeza e preocupação me abraçam e me beijam. Com pedido de desculpas pelas ausências constantes, por tentarem compreender as minhas limitações como mãe, onde me faz lembrar que eu posso ser uma pessoa melhor. *Amo muito vocês!*

*Ao meu paiinho, Josemary Vital de Araújo (saudades),*

Que me deu força para ir em busca de um sonho, que me deu exemplos e que acima de tudo nunca deixou de me dedicar seu amor e carinho e que mesmo não estando mais fisicamente ao meu lado nunca será esquecido e sempre será fonte de todas as minhas iniciativas. E dedico aos nossos sonhos, essa vitória!

*A vocês  
Dedico com todo amor!*

## Agradecimentos Especiais

*Algumas pessoas são especiais, pois fazem parte de nossa vida em todos os momentos, os de alegria, os de tristeza, os de pura irritação e aqueles onde nada de especial está para acontecer, mas quando estamos sozinhos nos lembramos delas. Graças a Deus essas pessoas são muitas e não caberiam num pedaço de papel, mas na minha memória todos vocês estão citados.*

A *Deus*, por mais uma vez, ter me colocado em uma prova e me mostrado que nada conseguiria se não fosse por intermédio do Seu sustento. Por ter me dado tantas forças, nos momentos de cansaço e impotência, onde muitas vezes pensei em desistir. Obrigada meu Deus!!!

*Por que eu, o Senhor, teu Deus, te tomo  
Pela tua mão direita e te digo: não  
temas, que Eu te ajudo. (Js.41.13)*

A minha mainha, *Maria da Paz Barbosa de Araújo*, por ter aberto mão dos seus sonhos em função dos meus, por me ajudar a trilhar todos os caminhos, pelo amor incondicional e pela ajuda em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo, *Rômulo Lemos*, por entender minhas ausências, pelo seu apoio, por acreditar nos meus sonhos e sonhar comigo, muitas vezes mais que eu, me forçando a continuar quando estava preste a desistir.

A minha querida irmã *Renata Cristina*, por saber que sempre pude contar com você, que sempre acreditou em mim e me apoiou, dizendo sempre as palavras certas nos momentos difíceis e que está torcendo para que tudo der certo e meus sobrinhos, *Matheus, Duda e Sofia*, por me fazerem uma pessoa melhor, menos egoísta, lembrando que tem um mundo lá fora.

Ao meu irmão, *Gustavo Henrique (Guga)*, que apesar da distância sempre me apoiou e por sempre acreditou na minha vitória.

*Amo muitos vocês!!!!*

A Profa. Dra. *Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho*, expresseo o meu sincero reconhecimento, admiração e gratidão, que com muita prestatividade e carinho, sempre me recebeu, me apoiou e me incentivou a continuar a caminhada. Uma pessoa maravilhosa, cujo exemplo de profissionalismo, dedicação e amizade sempre levarei comigo. A minha “*Mãe Científica*”, meu eterno agradecimento.

“*Mestre* é aquele que caminha com o tempo, propondo a paz, fazendo comunhão, despertando sabedoria. *Mestre* é aquele que estende a mão, inicia o diálogo e encaminha para a aventura da vida. Não é só aquele que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas aquele que também questiona e desperta para a realidade. Não é aquele que dá de seu saber, mas aquele que faz germinar o saber do discípulo. Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

*(Cora Coralina)*

## AGRADECIMENTOS

*Agradecer é um gesto de humildade e um ato que muitas vezes acaba sendo muito pequeno por tantas maravilhas que recebemos. Devo agradecer a todos, porque esta é uma tese que eu, de fato, jamais escreveria sem ajuda de um grande número de pessoas, por assim dizer, excepcionais, que se dispuseram a me ajudar, muitos mal me conheciam, e me guiaram esta minha ousadia de conhecer o desconhecido e ajudaram a dar-lhe forma e sentido. Agradeço aos Anjos da minha vida! A todos, obrigada de coração!*

Ao Prof. Dr. *Marcos Antônio Lemos Oliveira*, por ter depositado em mim seu crédito e confiança, além de ter se disponibilizado a orientar-me com seriedade e competência.

A *Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFPE*, berço da minha formação acadêmica e profissional.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq*, pela concessão da bolsa de estudo, importante para realização deste estudo.

A *Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba – EMEPA*, por ter me apoiado e me incentivado, sempre me liberando quando necessário, ter disponibilizado os animais e os funcionários, sua contribuição foi de grande importância para a realização desse doutorado.

Aos meus sogros, *Edson e Glória*, pelo carinho e apoio e por me darem suporte na família quando me ausentava.

A *Janaina Melo*, que se dispõe a me ajudar sem nem me conhecer, sempre prestativa e com seu alto astral, onde sem sua ajuda e perseverança com as análises ultra-estrutural não terei conseguido.

A *Fabianna Freitas*, pelo grande apoio com a colheita e transferência dos embriões, e principalmente pela sua amizade e calma quando mais precisamos.

Ao amigo, *Daniel Benitez*, pela sua amizade, apoio, e pelas palavras certas quando sempre precisava.

Ao amigo e Coordenador, *Gomes*, pelo grande apoio que me deu, sempre prestativo e disposto ajudar.

A *Marcela Pereira Pinto* (Doutoranda do PROTEN) e o *Prof. Ademir Amaral* (Departamento de Energia Nuclear /UFPE), pela leitura das lâminas das sondas fluorescente.

As técnicas do CETENE, *Carol, Jasi e Ceiza*, pelo processamento do material para a microscopia.

A *Christina Peixoto* (CETENE e AGEU MAGALHÃES), pela acolhida e apoio.

Aos *funcionários da Estação Experimental Benjamim Maranhão e de Pendência*, pela colaboração e dedicação.

A *Ana Paula e a Hertape Callier*, pela doação dos hormônios (Pluset), a qual contribuiu muito para a realização dos experimentos.

A *Expedito e a Pfiser*, pela doação dos hormônios (CIDR), a qual contribuiu bastante para a realização dos experimentos.

A secretária da Pós-graduação, *Edna*, pela atenção e constante disponibilidade em ajudar.

Aos *colegas de Doutorado*, pelo convívio prazeroso neste anos de estudo.

Aos *animais*, pela sua existência.

*As demais pessoas queridas, que não cito seus nomes, pois poderia esquecer-me de alguém, sendo injusta, mas que vivenciaram, compartilhando e ajudando-me este trabalho, chegando até aqui. A todos muito obrigada!!*



*"Hoje levantei pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia-noite. É minha função escolher que tipo de dia terei hoje. Posso reclamar que está chovendo ou agradecer as águas por levarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo. Posso me queixar dos meus pais por não terem dado o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto para morar. Posso lamentar decepções com os amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saírem como planejei, posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente, esperando para ser o que quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar a forma. Tudo depende de mim..."*

**Charles Chaplin (1889-1977)**

**Título: Viabilidade de embriões caprinos e ovinos produzidos *in vivo* após criopreservação utilizando etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida**

**Autor:** Paula Fernanda Barbosa de Araújo Lemos

**Orientador:** Marcos Antonio Lemos de Oliveira

**RESUMO**

A possibilidade de utilizar um protocolo de criopreservação prático, rápido e eficaz, como a vitrificação, estimularia a aplicação da técnica associada à transferência de embriões por um maior número de equipes em nível de campo. Porém, faz-se necessário o desenvolvimento de protocolos específicos que resultem no incremento da viabilidade embrionária. O objetivo deste trabalho foi identificar os danos causados pela criopreservação, avaliando a viabilidade morfológica e ultra-estrutural de embriões caprinos e ovinos submetidos a criopreservação pelo método clássico e pela vitrificação em OPS (Open Pulled Straw). No experimento 1, os embriões (N=246) foram obtidos de cabras da raça Boer superovuladas. Os embriões foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle (n= 75) - congelamento pelo método clássico, Grupo DMSO (n= 74) – vitrificação e Grupo DF(n= 74) – vitrificação. Os embriões destinados ao congelamento clássico foram congelados utilizando congelador automático de embriões. Antes da congelamento os embriões ficaram cinco minutos estabilizando na solução de Etilenoglicol (EG). Os embriões do grupo DMSO foram equilibrados em solução de 10% de EG e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e depois transferido para solução de vitrificação com 20% EG e 20%DMSO +0,5 sacarose. Os embriões do grupo DF foram equilibrados em solução de 10% de EG e 10% de Dimetilformamida (DF) e depois transferido para solução de vitrificação com 20% EG e 20% DF+0,5 sacarose. No experimento 2, os embriões ovinos (N=186) foram obtidos de ovelhas da raça Santa Inês superovuladas. Os embriões foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle (n= 55) - congelamento pelo método clássico, Grupo DMSO (n=54) – vitrificação e Grupo DF (n= 55) – vitrificação. Os embriões destinados ao congelamento clássico foram congelados utilizando congelador automático de embriões. Antes da congelamento os embriões ficaram cinco minutos estabilizando na solução de Etilenoglicol (EG). Os embriões do grupo DMSO foram equilibrados em solução de 10% de EG e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) e depois transferido para solução de vitrificação com 20% EG e 20% DMSO+0,5 sacarose. Os embriões do grupo DF foram equilibrados em

solução de 10% de EG e 10% de Dimetilformamida (DF) e depois transferido para solução de vitrificação com 20% EG e 20% DF+0,5 sacarose. Os embriões foram avaliados por meio da análise da viabilidade embrionária pelo uso de sondas fluorescentes, utilizou-se Iodeto de Propídeo e Hoechst 33342, verificou-se nos embriões caprinos, que o grupo controle mantiveram grande parte das suas células integras após o descongelamento, 33,33% das amostras apresentaram-se lesionadas. Os embriões do grupo DMSO analisados, 26,66% estavam com suas células totalmente danificadas. O grupo DF apresentou 60% das amostras com lesões. O estudo ultra-estrutural por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que os embriões vitrificados revelaram uma maior preservação das células. Os embriões vitrificados com DMSO tiveram maiores taxas de sobrevivência *in vitro* (47,36%), os vitrificados com DF tiveram uma taxa de sobrevivência *in vitro* (31,58%), os congelados pelo método clássico obtiveram *in vitro* (25%). Nos embriões ovinos verificamos na análise por sonda fluorescente, que as células do grupo controle mantiveram viáveis em todos os embriões analisados, resultado semelhante ocorreu com o grupo DF, onde 80% das amostras foram consideradas viáveis, diferente do grupo DMSO, que tiveram 50% de viabilidade. O estudo ultra-estrutural demonstrou que os achados foram semelhantes entre os grupos controle e DF. Os embriões vitrificados com DF tiveram maiores taxas de sobrevivência *in vitro* (53,33%) e *in vivo* (45%), os vitrificados com DMSO tiveram uma taxa de sobrevivência *in vitro* (26,66%) e *in vivo* (30%) e os congelados pelo método clássico obtiveram (33,33%) *in vitro* e (40%) *in vivo*. Podemos concluir que, a solução de vitrificação contendo 20% de etilenoglicol + 20% de dimetilsulfóxido + 0,5M sacarose é um método eficiente para a vitrificação de embriões caprinos produzidos *in vivo*. Entretanto em embriões ovinos, a associação de 20% de etilenoglicol + 20% de dimetilformamida + 0,5M de sacarose, foi o crioprotetor que apresentou melhor viabilidade embrionária, demonstrando causar menos lesões ao citoesqueleto e as organelas celulares, como isso apresentando um índice de gestação satisfatório.

**Palavras-chaves:** Caprinos, criopreservação, crioprotetores, embriões, microscopia eletrônica de transmissão, ovinos, sondas fluorescentes, vitrificação.

**Título:** Viability of goats and sheep embryos produced in vivo after cryopreservation using ethylene glycol, dimethylsulfoxide and dimethylformamide

**Author:** Paula Fernanda Barbosa de Araújo Lemos

**Advisor:** Marcos Antonio Lemos de Oliveira

## **ABSTRACT**

The possibility of using a practical, fast and effective protocol for embryo cryopreservation such as glazing, may stimulate the application of the technique associated with embryo transfer by a larger number of teams at field level. However, it is necessary to develop specific protocols that result in increased embryonic viability. The objective of this study was to identify the damage caused by cryopreservation, assessing the morphological and ultrastructural feasibility of goat and sheep embryos undergoing cryopreservation of classic and vitrification in OPS (Open Pulled Straw). In experiment 1, embryos (N = 246) were obtained from superovulated Boer goats. The embryos were randomly divided into three groups: control group (n = 75) - freezing the classic method, DMSO group (n = 74) - vitrification and Group DF (n = 74) - vitrification. Embryos in the classic method group were frozen using automatic freezing. Before freezing the embryos were left five minutes in the stabilizing solution of Ethylene glycol (EG). The embryos of the second group were placed in a DMSO solution containing 10% EG and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and then transferred to a vitrification solution with 20% EG and 20% DMSO +0.5 sucrose. The embryos of the third group were placed in a balanced solution containing 10% EG and 10% Dimethylformamide (DF) and then transferred to a vitrification solution with 20% EG and 20% sucrose +0.5 DF. In experiment 2, sheep embryos (N = 186) were obtained from superovulated Santa Ines ewes. The embryos were randomly divided into three groups: control group (n = 55) - freezing the classic method, DMSO group (n = 54) - vitrification and Group DF (n = 55) - vitrification. Embryos in the classic method group were frozen using automatic freezing. Before freezing the embryos were left five minutes in the stabilizing solution of Ethylene glycol (EG). The embryos of the second group were placed in a DMSO solution containing 10% EG and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and then transferred to a vitrification solution with 20% EG and 20% DMSO

+0.5 sucrose. The embryos of group three were placed in a balanced solution containing 10% EG and 10% Dimethylformamide (DMF) and then transferred to a vitrification solution with 20% EG and 20% sucrose +0.5 DMF. The embryos were evaluated by analysis of embryonic viability by the use of fluorescent probes, in this case propidium iodide and Hoechst 33342. Results indicate that in goat embryos, the control group maintained most of its viable cells after thawing with 33.33% of samples injured. Of embryos in the DMSO group, 26.66% had totally damaged cells. The DMF group had 60% of samples with lesions. The ultrastructural study by transmission electron microscopy showed that the vitrified embryos had a greater preservation of cells. The vitrified embryos with DMSO had higher rates of in vitro survival (47.36%), followed by embryos glazed with the DMF with a lower in vitro survival rate (31.58%), and lastly embryos frozen by the traditional method (25%). In sheep embryos found in the analysis by fluorescent probe, cells in the control group remained viable in all embryos analyzed, a similar result occurred with the DMF group, where 80% of samples were deemed feasible, other than the DMSO group, which had 50% viability. The ultrastructural study showed that the findings were similar between the control and DMF groups. Embryos vitrified with DMF had higher rates of in vitro survival (53.33%) and in vivo (45%), the glazed with DMSO had an in vitro survival rate (26.66%) and in vivo (30%) and embryos frozen by the traditional method (33.33%) in vitro and (40%) in vivo. It can be concluded that the vitrification solution containing 20% ethylene glycol + 20% dimethylsulfoxide + 0.5 M sucrose is an effective method for cryopreservation of goat embryos produced in vivo. However, in sheep embryos, the combination of 20% ethylene glycol + 20% dimethylformamide + 0.5 M sucrose was the best cryoprotectant regarding embryo viability, demonstrating to cause less damage to the cytoskeleton and cell organelles, and presenting a satisfactory pregnancy rate.

**Keywords:** Goats, cryopreservation, cryoprotectants, embryos, transmission electron microscopy, sheep, fluorescent probes, vitrification.

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1 -</b>	Qualidade embrionária e suas características.	45
<b>Tabela 2 -</b>	Taxas de re-expansão de embriões caprinos criopreservados pelos método clássico (Controle) e por vitrificação (DMSO e DF).	70
<b>Tabela 3 -</b>	Taxa de re-expansão de embriões ovinos criopreservados pelos método clássico (Controle) e por vitrificação (DMSO e DF).	95
<b>Tabela 4 -</b>	Taxa de gestação após inovulação de embriões ovinos criopreservados pelo método clássico (Controle) e por vitrificação (DMSO e DF).	95

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Blastocistos expandidos coletados de cabras Boer, corados com Iodeto de Propídeo e Hoechst 33342 e examinados sob microscópio de fluorescência. O embrião da esquerda apresenta 100% de suas células íntegras (azuis) e o embrião da direita, apresentando grande número de células lesadas (vermelhas). 50
- Figura 2 -** Características ultra-estruturais de embriões caprinos criopreservados pelo métodos clássico lento (Grupo controle). A- Mitocôndrias intumescidas e rompidas, diminuição das microvilosidades. B- Zona pelúcida íntegra e presença de microvilosidades. C – Perda das junções comunicantes. D- Presença de vacúolos. 60
- Figura 3 -** Características ultra-estruturais de embriões caprinos criopreservados pela vitrificação (Grupo DF). A – Células com pouca uniformidade, muitas mitocôndrias, perda das junções comunicantes (seta fina), núcleo (n); B – Algumas mitocôndrias intumescidas e rompidas (m\*); C – Células desorganizadas e muitas mitocôndrias (m); D – Presença de ribossomos (r) e mitocôndrias com suas criptas evidentes. 61
- Figura 4 -** Características ultra-estruturais de embriões caprinos criopreservados pela vitrificação (Grupo DMSO). A – Células com aspecto mais uniforme; B – Presença de Zona Pelúcida (Zp) e mitocôndrias (m); C- Junções comunicantes e presença de alguns vacuolos (v); D – Núcleo (n) organizado e presença de vacuolos (v) 62
- Figura 5 -** Blastocistos expandidos coletados de ovelhas Santa Inês, corados com Iodeto de Propídeo e Hoechst 33342 e examinados sob microscópio de fluorescência. O embrião da esquerda apresenta 100% de suas células íntegras (azuis) e o embrião da direita, classificado como grau 2, apresentou algumas de suas 74

células da periferia lesadas (vermelhas).

- Figura 6 -** Características ultra-estruturais de embriões ovinos criopreservados pelo métodos clássico lento (Grupo controle). 87  
A- Presença de microvilosidades e algumas mitocôndrias; B- Mitocôndria rompida.; C – Mitocôndrias e vacuolos; D- Junções comunicantes
- Figura 7 -** Características ultra-estruturais de embriões ovinos criopreservados pela vitrificação (Grupo DF) 88  
A- Complexo de Golgi (CG) e algumas mitocôndrias; B-. Núcleo (n) e membrana nuclear (seta) íntegros.; C – Mitocôndrias (m); D- Microvilosidades e algumas mitocôndrias.
- Figura 8 -** Características ultra-estruturais de embriões ovinos criopreservados pela vitrificação (Grupo DMSO) 89  
A- Célula totalmente desorganizadas, com graves lesões; B-. Núcleo (n) com membrana nuclear rompida (setas).; C – Mitocôndrias (m) e vacuolos (v); D- Mitocôndrias e presença das junções comunicantes (setas).



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	Porcento
<b>µl</b>	Micro litro
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>DF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPB</b>	Dubelco's Phosphate Buffered
<b>EG</b>	Etilenoglicol
<b>FIV</b>	Fertilização <i>in vitro</i>
<b>FSH</b>	Hormônio folículo estimulante
<b>g</b>	grama
<b>hCG</b>	Gododotrofina coriônica humana
<b>HM</b>	Holding Medium – Meio de manutenção
<b>IETS</b>	Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (International Embryo Transfer Society)
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>M</b>	Molar
<b>mL</b>	Mililitro
<b>N</b>	Número
<b>N<sub>2</sub></b>	Nitrogênio
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>OPS</b>	Open Pulled Straw
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SOF</b>	Fluido Sintético de Oviduto
<b>SM</b>	Sucrose Medium – meio de sacarose
<b>TCM 199</b>	Tissue Culture Médium

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	10
<b>ABSTRACT</b>	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	20
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b>	22
<b>2.1 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES</b>	22
2.1.1 Princípios da Criopreservação	22
2.1.2 Ação dos Crioprotetores	26
2.1.3 Agentes Crioprotetores	29
2.1.3.1 Crioprotetores Intracelulares	29
2.1.3.2 Crioprotetores Extracelulares	32
2.1.4 Remoção do Crioprotetor	33
2.1.5 Congelamento Clássico Lento ou Tradicional	34
2.1.6 Vitrificação	35
2.1.7 Recipientes para envase dos embriões	40
2.1.8 Inovulação	42
2.1.9 Análise da qualidade embrionária	43
<b>3. OBJETIVOS</b>	46
3.1 Geral	46
3.2 Específico	46
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	47
<b>CAPÍTULO 1: Características morfológicas e ultra-estruturais de embriões caprinos produzidos <i>in vivo</i> submetidos à criopreservação com diferentes crioprotetores</b>	60
Resumo	60
Abstract	61
Introdução	62
Material e métodos	63
Resultados	68
Discussão	70
Conclusões	75
Referências bibliográficas	76

Figuras	79
<b>CAPÍTULO 2: Comparação de diferentes protocolos de vitrificação em OPS (Open Pulled Straw) sobre a viabilidade de embriões ovinos produzidos <i>in vivo</i></b>	83
Resumo	83
Abstract	84
Introdução	85
Material e métodos	86
Resultados	92
Discussão	95
Conclusões	101
Referências bibliográficas	102
Figuras	106
<b>ANEXOS</b>	110

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, os caprinos e ovinos destacaram-se por serem espécies de grande importância para o homem, produzindo lã e pele para as vestimentas, carne e leite para a alimentação. Hoje, encontram-se difundidas em quase todos os continentes, especialmente no Brasil, que além da grande dimensão, apresenta condições ambientais favoráveis para produzir caprinos e ovinos em grande escala.

A caprino-ovinocultura na região Nordeste do Brasil, que outrora somente apresentava baixo desempenho produtivo decorrente da ausência marcante de tecnologia, na atualidade tem experimentado significativo progresso na qualidade genética dos rebanhos. O emprego de biotécnicas reprodutivas tem motivado a substituição do modelo tradicional de criação pelo tecnificado, que objetiva a produção em escala de agronegócio e sua modernização vêm requerendo o aprimoramento e o desenvolvimento de novas tecnologias em diversas áreas do conhecimento.

A biotecnologia aplicada à reprodução é um recurso que tem determinado o crescimento da atividade, tornando-a mais competitiva e mais lucrativa. Dentre aquelas relacionadas à reprodução de sêmen e embriões, tem se destacado a criopreservação.

A otimização da criopreservação de embriões possibilitará aumento da produtividade de animais de elevado valor genético, a formação de bancos de germoplasma, mantendo a variabilidade genética entre as raças, preservando espécies e raças ameaçadas de extinção, além de manter a biodiversidade genética animal.

A criopreservação tem como finalidade viabilizar economicamente a biotecnologia da transferência de embriões, possibilitar uma avaliação futura do melhoramento animal por permitir que um grande número de características genéticas sejam confrontadas ao longo do tempo. Permite o armazenamento de embriões por tempo indeterminado, eliminando a necessidade de sincronizar o ciclo estral entre doadoras e receptoras, planejar partos em épocas ideais, simplificar o transporte, a exportação e a importação de espécies e raças de interesse zootécnico ou zoológico, além de facilitar a introdução de raças exóticas e minimizar o risco de introduzir doenças exóticas.

Dentre os métodos de criopreservação de embriões, a congelação tradicional e a vitrificação são métodos em evidência. A vitrificação tem sido apontada como uma importante alternativa por permitir o armazenamento de material biológico por tempo

indeterminado sem que percam a atividade funcional e sem que ocorra alterações genéticas (WHITTINGHAM, 1980; SCHNEIDER e MAZUR, 1984).

Na década passada, diversas metodologias foram utilizadas na criopreservação de embriões ovinos (NAITANA et al., 1997; MARTINEZ e MATKOVIC, 1998) e bovinos (MAHMOUDZADEH et al., 1994; VAJTA et al., 1998), sendo hoje, a vitrificação, uma alternativa em potencial para a técnica de congelamento tradicional.

A vitrificação tem como objetivo manter o metabolismo celular em estado de quiescência, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado, sem a formação de cristais de gelo intra e extracelulares. A vitrificação é um processo rápido, prático e menos oneroso do que a congelação tradicional (BARIL et al., 2001), porém, ainda são escassos os resultados com esta técnica para algumas espécies domésticas, principalmente no Brasil.

No processo de vitrificação podem ocorrer alterações da osmolaridade, concentração e do tempo de exposição dos embriões aos crioprotetores. Portanto, o sucesso da técnica depende, principalmente, da determinação da concentração ideal e do tempo de exposição às soluções crioprotetoras (RALL e FAHY, 1985). A utilização da velocidade máxima de resfriamento, associada à concentração aceitável de crioprotetores minimiza as alterações decorrentes do processo (LIEBERMAN et al., 2002). O êxito da vitrificação depende também do estágio de desenvolvimento e a fonte dos embriões (*in vivo* ou *in vitro*). Dessa forma, Vajta et al. (1998) demonstraram que a viabilidade de embriões bovinos vitrificados no estágio de blastocisto expandido é maior do que no estágio de mórula devido a sua maior tolerância ao resfriamento depois da formação da blastocele.

Diferentes crioprotetores e protocolos de vitrificação vêm sendo utilizados para criopreservar embriões nas duas últimas décadas. Eles diferem quanto ao tipo e concentração de crioprotetores, números de etapas para equilíbrio do embrião ao meio, técnica de criopreservação, tempo de exposição e números de etapas para descongelação (VAJTA et al., 1998). No entanto, até hoje não foi proposto um protocolo ideal para a criopreservação de embriões. Dentre os agentes crioprotetores testados, os mais utilizados são o glicerol, etilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO). Dessa forma, a vitrificação se torna mais importante e amplamente utilizada quando forem estabelecidos protocolos definidos e com sucesso comparável ou superior a congelação tradicional. Assim, torna-se clara a necessidade de um número maior de pesquisas envolvendo diferentes crioprotetores e metodologias para a difusão desta técnica.

Este estudo teve como objetivo identificar os danos causados pela criopreservação de embriões caprinos e ovinos produzidos *in vivo*, comparando o uso de diferentes agentes crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (DF) em associação com etilenoglicol (EG) na vitrificação de embriões caprinos e ovinos, realizando análises de viabilidade embrionária através do uso de sondas fluorescentes; ultra-estrutural dos embriões por microscopia eletrônica de transmissão; taxas de re-expansão embrionária através do cultivo em estufa de CO<sup>2</sup>, comparar a viabilidade embrionária quanto a taxa de prenhez de embriões ovinos criopreservados pelos métodos clássico e por vitrificação.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES**

#### **2.1.1. Princípios da Criopreservação**

Os termos “criopreservação” e “congelamento” não são sinônimos. Criopreservação refere-se a preservação de células através do armazenamento a baixas temperaturas, induzindo a parada quase que total da atividade enzimática intracelular, da respiração celular, do metabolismo, do crescimento, da multiplicação, enfim, através da redução drástica da atividade fisiológica, enquanto congelamento significa a mudança do estado líquido para sólido. Da mesma forma que a água se transforma em gelo, os óleos se transformam em gordura quando a temperatura é abaixada. Um processo similar deve ocorrer com os lipídeos das membranas celulares. Desta forma, muitos outros eventos acontecem durante o processo de criopreservação celular, além da simples mudança da água para gelo (SEIDEL, 1986 e 1989).

Whittingham et al.(1972) e Wilmot (1972) foram os primeiros a relatarem sobre a possibilidade de embriões de camundongos resistirem à congelamento e descongelamento. Esses trabalhos basearam-se nos resultados das pesquisas para a congelamento de sêmen iniciadas por Polge et al. (1949), os quais mostraram, pela primeira vez, a ação positiva do glicerol como crioprotetor para o sêmen de aves. Esses autores concluíram, naquela época, que uma congelamento celular apenas pode ter sucesso se realizada com curvas lentas de congelamento.

Leibo (1984) afirmou que o sucesso da criopreservação de embriões requer que estes sobrevivam às agressões provocadas pela exposição à soluções não-fisiológicas concentradas, transformação de fase do meio de suspensão, resfriamento até a estocagem, descongelamento e retorno às condições fisiológicas.

O congelamento de ovócitos e embriões abaixo de zero é uma situação que nunca se encontram em condições fisiológicas. Por conseguinte, para sobreviver às condições inadequadas, há a necessidade de apoio externo. Lesões podem ocorrer em todas as fases da criopreservação. Compreender as causas e mecanismo do dano pode contribuir para o desenvolvimento dos métodos da criopreservação e evitar danos irreversíveis. Durante o resfriamento, três tipos de danos podem ser distinguidos de acordo com as diferentes temperaturas que as células passam. Em temperaturas relativamente elevadas entre 15 e -5°C, onde os danos pelo frio são o fator principal, prejudicando principalmente as gotículas lipídicas citoplasmáticas e os microtúbulos do

fuso meiótico. Entre  $-5$  e  $-80^{\circ}\text{C}$ , predominantemente a formação de cristais de gelo intracelular, onde é a principal fonte de prejuízo, enquanto entre  $-50$  e  $-150^{\circ}\text{C}$  ocorre fraturas na zona pelúcida ou danos ao citoplasma (VAJTA, 2006).

Dessa forma, os danos causados aos tecidos durante os processos de congelação e descongelação são devido principalmente à formação de cristais de gelo intracelulares que afetam a estrutura da célula, a concentração de soluto resultante do processo de desidratação que ocorre durante a congelação tanto no meio extra como intracelular e a interação entre esses dois fatores. A natureza exata dos danos causados pela congelação aos tecidos não está totalmente esclarecida. Aparentemente, o dano causado pela congelação é consequência da pressão diferencial de vapor entre o gelo e a água, em temperaturas abaixo de  $0^{\circ}\text{C}$ . Teoricamente, uma grande pressão de vapor de água pode acarretar injúria por desidratação durante a congelação lenta e à ruptura das membranas celulares durante a congelação rápida (PICKETT, 1986).

Um dos princípios mais importantes da criopreservação consiste na necessidade de se remover o máximo possível de água das células antes da congelação. Se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo serão formados lesionando a estrutura intracelular. No entanto, a remoção em excesso de água das células também pode ser deletéria (SEIDEL Jr., 1986).

O principal solvente biológico responsável pelo transporte de nutrientes e substâncias químicas é a água, que em estado puro forma cristais a  $0^{\circ}\text{C}$ , e quando contém íons e/ou outras substâncias em solução congela a temperaturas mais baixas, dependendo da concentração e natureza dessas. Quando ocorre a congelação das soluções aquosas, parte da água forma cristais de água pura, tornando a solução restante cada vez mais concentrada (PICKETT e BERNDTSON, 1978). Este processo provoca um aumento da pressão osmótica na célula, uma vez que a concentração total de solutos dentro e fora deve estar sempre em equilíbrio. Em resposta a este estresse, a água sai da célula e o soluto entra. O processo cessa quando a concentração de soluto torna-se grande o bastante para prevenir futuras transformações de água em gelo (STOREY e STOREY, 1990).

Durante congelações rápidas ocorre a formação de pequenos cristais de gelo intracelulares que podem provocar lesões mecânicas à microestrutura das membranas celulares, bem como danos de natureza osmótica se a velocidade de descongelação for lenta. Esse processo de rearranjo e fusão desigual durante um descongelamento lento é denominado recristalização. Durante a recristalização ocorre a formação de cristais



maiores que podem causar lesões à membrana e às organelas celulares. Há uma relação direta entre a velocidade de congelação e descongelação. Embriões congelados pelo método lento necessitam que o descongelamento também seja lento, com velocidades entre 4<sup>o</sup>C e 27<sup>o</sup>C/minuto (WHITTINGHAM, 1980). Por outro lado, embriões congelados com curvas rápidas precisam, do mesmo modo, serem descongelados de forma rápida (200<sup>o</sup>C à 1.000<sup>o</sup>C/minuto). Se a velocidade de descongelação for rápida, a temperatura crítica, na qual ocorre a recristalização, é ultrapassada rapidamente, não havendo tempo hábil para que ocorra o rearranjo dos cristais intracelulares.

Como resultado dos danos causados pelos efeitos da solução, as células de mamíferos, independente do grau de desidratação, não sobrevivem a resfriamentos abaixo de -20<sup>o</sup>C, a não ser que se utilize um crioprotetor (SZELL e SHELTON, 1986).

Se a redução do volume celular atingir um mínimo crítico, a bicamada de fosfolípídeos da membrana celular fica muito comprimida e sua estrutura quebra. Com isso, as funções de transporte e proteção da membrana não podem ser mantidas e rupturas na membrana se tornam porta de entrada do gelo extracelular para o interior da célula (STOREY e STOREY, 1990). Desta forma, para que uma substância tenha uma boa ação crioprotetora, deve atuar elevando a osmolaridade intracelular para controlar a desidratação e deve ainda interagir com a membrana celular para estabilizá-la (MERYMAN, 1974).

A propensão de um ovócito para sobreviver à criopreservação depende de seu tamanho (LeGAL et al., 1994; AL-HASINI e DIEDRICH, 1995) e do estágio celular em que se encontra (OTOI et al., 1995). Quanto maior o volume do ovócito, maior o tempo necessário para que a célula atinja o equilíbrio osmótico em presença de crioprotetores. Desta forma, sucesso limitado na criopreservação tem acontecido em espécies com ovócitos muito grandes, entretanto, o tamanho tem feito do ovócito uma célula exemplar para o estudo teórico de princípios da criopreservação, como os coeficientes de permeabilidade (LeGAL et al., 1994; AL-HASINI e DIEDRICH, 1995). Isto explica o motivo da criopreservação de ovócitos bovinos serem difícil de realizar com sucesso e resultar em baixas taxas de produção de blastocistos após o aquecimento, fertilização *in vitro* (FIV) e cultura *in vitro*, pois devido ao seu grande tamanho é mais difícil para a água e os crioprotetores se moverem através da membrana plasmática (SEIDEL Jr., 2006).

Tendo em vista as condições hipertônicas das células embrionárias ao final do congelamento, deve-se prevenir a ocorrência de choque osmótico em função do

reingresso rápido da água para o interior celular durante o descongelamento e a diluição dos crioprotetores. O descongelamento é um procedimento de diluição, embora esta não se complete totalmente durante este processo, podendo ocorrer o choque osmótico das células quando os embriões são colocados em soluções isotônicas, imediatamente a descongelação (MAZUR, 1970; LEIBO, 1977; LEHN-JENSEN, 1984).

No caso de embriões congelados, as taxas de resfriamento e aquecimento a composição do meio de congelação são os principais fatores críticos que influenciam na viabilidade pós-aquecimento. O resfriamento pode causar injúria celular pela exposição prolongada numa solução extremamente concentrada, causando o dano denominado “efeito da solução”, e ainda pode causar injúria celular pela formação de gelo intracelular. Embriões resfriados apropriadamente devem também ser aquecidos numa taxa ótima para evitar danos provocados pelo choque osmótico ou recristalização do gelo durante o processo de aquecimento (HOCHI et al., 2001).

Segundo Mazur (1977), ao adicionar crioprotetor ao meio contendo embriões, o ponto de solidificação é abaixado, sendo que a formação de gelo extracelular se inicia entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-15^{\circ}\text{C}$ , porém as células continuam descongeladas e super resfriadas. Como mencionado anteriormente, a formação de gelo extracelular determina um aumento da concentração de solutos fora do embrião, provocando a saída de água de dentro da célula. Se a célula for resfriada rapidamente, a água intracelular poderá não sair em quantidade suficiente, formando uma maior quantidade de cristais de gelo intracelular que leva a lise das membranas. Por outro lado, se a congelação for muito lenta, a célula perde água com rapidez adequada para manter em equilíbrio seu potencial químico, porém a desidratação progressiva provoca uma elevação da concentração de eletrólitos no meio celular, modificando suas propriedades físico-químicas (efeito solução), determinando a perda de viabilidade celular (BARIL *et al.*, 1995).

O intervalo de tempo em que ocorre o retorno ao volume inicial, atingindo-se o equilíbrio osmótico, está relacionado com a espécie animal do embrião em questão, com estágio de desenvolvimento, com a relação superfície/volume do embrião, com as características intrínsecas do crioprotetor e com a temperatura em que o embrião é exposto. De acordo com Leibo et al. (1996), esses aspectos relativos à permeabilidade de membrana explicam em parte, as diferenças observadas entre os vários crioprotetores, quanto à eficiência.

### **2.1.2. Ação dos Crioprotetores**

Os principais componentes para o sucesso da criopreservação são as soluções de crioprotetores. Os crioprotetores são essenciais para a desidratação da água intracelular, além deles baixarem o ponto de congelamento, dando assim mais tempo para a desidratação. Uma seleção criteriosa dos crioprotetores deve ser feita, no entanto, em primeiro lugar para a toxicidade e a segunda para a permeabilidade (AGCA et al., 1998).

A maior parte das células de mamíferos não resiste ao congelamento abaixo de -20°C, independente da velocidade de resfriamento adotada, a menos que um aditivo crioprotetor seja adicionado (WHITTINGHAM, 1980). Os crioprotetores têm a função proteger as células e tecidos durante a criopreservação e descongelação. Considerando as inter-relações dos crioprotetores, eles podem ser divididos em dois grupos: crioprotetores intracelulares, que penetram a membrana celular e exercem sua ação no interior das células e crioprotetores extracelulares, que agem sobre a membrana celular sem penetrarem nas células (McGANN, 1978; KASAI E MUKAIDA, 2004; VAJTA E NAGY, 2006; PEREIRA E MARQUES, 2008).

O funcionamento do crioprotetor está relacionado aos processos de sua entrada e saída da água na pré-congelação; entretanto, na descongelação dos embriões este processo é inverso. Segundo Schneider e Mazur (1984) o embrião quando exposto a um crioprotetor intracelular, retrai devido a perda de água causada pela hiperosmolaridade inicial do meio extracelular, e também porque o embrião é mais permeável a saída de água do que a entrada do crioprotetor. O índice de entrada do crioprotetor depende do coeficiente de permeabilidade deste e da temperatura da solução. O equilíbrio é atingido quando o embrião retorna ao seu volume anterior em meio isotônico.

Considerando que o mecanismo de ação dos crioprotetores ainda não está bem esclarecido, baseia-se na ação dos crioprotetores, principalmente no abaixamento do ponto de solidificação da solução na congelação. Assim é determinado maior tempo para que ocorra desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares (MAZUR, 1970 e 1980; LEIBO, 1977; MERYMAN et al., 1977; MCGANN, 1978; JONDET et al., 1984; LEHN-JENSEN, 1984).

A redução da formação de cristais de gelo, não elimina possibilidade da ocorrência de danos celulares, como os de origem tóxica ou osmótica. Fahy (2004) relata que existem três tipos de efeitos tóxicos dos crioprotetores sobre as células. O primeiro é denominado toxicidade específica, que é própria de cada agente crioprotetor.

Os efeitos químicos, onde através de vias e sítios celulares definidos, destroem a estrutura celular e impedem os processos enzimáticos vitais, onde pode ocorrer alterações hidrofóbicas da membrana, mudança da constante dielétrica, potencial redox, força iônica, pH, tensão de superfície. O segundo efeito é a toxicidade indireta, mediada pelas alterações na localização da água nas moléculas hidratadas e o último é o da desnaturação das proteínas.

As lesões osmóticas são originadas por alterações do volume celular durante a adição e a diluição das soluções crioprotetoras (KASAI, 2002). A desidratação excessiva causa redução exagerada do volume celular e resulta no denominado efeito da solução, que se caracteriza pela precipitação dos componentes celulares. Segundo Vajta e Nagy (2006), essas alterações podem ser controladas através do emprego de curvas de resfriamento mais rápidas e soluções crioprotetoras mais estáveis e menos tóxicas. As rápidas taxas de resfriamento podem diminuir as injúrias celulares através da passagem direta pela zona perigosa de resfriamento que está entre + 15°C e - 5°C (MARTINO et al., 1996a).

As características fundamentais para um eficiente agente crioprotetor é o baixo peso molecular, alta capacidade de atravessar a membrana celular e ser de baixa toxicidade. Em geral, agentes com rápida capacidade de penetração são mais favoráveis, porque o tempo de exposição ao crioprotetor, antes do rápido resfriamento é curto, prevenindo assim, as injúrias osmóticas (KASAI,1996). A velocidade de permeação de um crioprotetor depende de vários fatores, tais como, espécie, estágio de desenvolvimento e relação superfície/volume do embrião, com a natureza e concentração do crioprotetor e a temperatura de exposição (LEIBO, 1984).

A interação do crioprotetor com a membrana celular exerce ação estabilizadora durante as mudanças do estado relativamente líquido para o estado sólido, e talvez até mais importante, no retorno ao estado líquido na descongelação. Neste caso, o crioprotetor parece diminuir a fragilidade das membranas, impedindo que se quebrem (SEIDEL Jr., 1986). Além disso, alguns crioprotetores como o DMSO, podem inibir a atividade da catalase e da peroxidase, diminuindo a produção de radicais livres envolvidos nas injúrias causadas pela congelação (RAMMLER, 1967).

Outra possível ação dos crioprotetores é a de diminuir os efeitos das altas concentrações osmóticas durante a desidratação celular. Muitas moléculas dissolvem-se na mistura crioprotetor/água, que é menos lesivo do que quando dissolvidas em altas concentrações de líquido na ausência do crioprotetor. Portanto, devem-se utilizar

concentrações crescentes de crioprotetores para permitir ao embrião, tempo suficiente para o equilíbrio osmótico, uma vez que na presença dos mesmos, aumentaria significativamente a sua osmolaridade (SEIDEL Jr., 1986).

Segundo Schneider e Mazur (1984), o embrião exposto a um crioprotetor intracelular, retrai devido à perda de água causada pela hiperosmolaridade inicial do meio extracelular, e também porque o embrião é mais permeável à saída de água do que à entrada do crioprotetor. O índice de entrada do crioprotetor depende do coeficiente de permeabilidade deste e da temperatura da solução. O equilíbrio é atingido quando o embrião retorna ao seu volume anterior em meio isotônico.

Os crioprotetores extracelulares permitem a redução da concentração dos crioprotetores intracelulares, diminuindo a toxicidade celular. Segundo Rall (1987), a sacarose tem o efeito adicional de proteção celular, pois este crioprotetor extracelular causa desidratação nos embriões, reduzindo a quantidade de água no citoplasma da célula, evitando a formação de gelo intracelular. Entretanto, Martinez et al. (2002) demonstraram que altas concentrações de sacarose (0,5M) resultaram em baixas taxas de nascimento para embriões de bovinos.

Ao mesmo tempo em que podem exercer efeitos protetores durante o congelamento, os crioprotetores, nas concentrações geralmente necessárias para prevenir danos, podem ser tóxicos as células, especialmente com elevação da temperatura (LEHN-JENSEN, 1984; SCHNEIDER e MAZUR, 1984).

A congelação e os agentes crioprotetores parecem alterar o equilíbrio entre os fatores fundamentais envolvidos na manutenção da estabilidade das estruturas biológicas (FAHY, 1986). Tanto as baixas temperaturas a que são submetidos os ovócitos, quanto a adição de substâncias crioprotetoras modificam a organização dos microfilamentos de actina. Efeitos deletérios no citoesqueleto de actina foram observados após a criopreservação de ovócitos bovinos. Devido à associação dos microfilamentos com outras estruturas, é possível que sua destruição seja o resultado de danos em outros componentes celulares como a membrana plasmática ou mitocôndria. Sendo assim, quando a distribuição normal dos microfilamentos é modificada após a exposição aos crioprotetores e à vitrificação, alterações irreversíveis de outros componentes celulares podem ter ocorrido, como a liberação precoce das enzimas dos grânulos corticais. Estas mudanças podem prevenir completamente a fecundação ou incompletamente o bloqueio à polispermia, ambos levando à diminuição das taxas de clivagem após a inseminação (ALBARRACÍN et al., 2005).

Apesar dos efeitos benéficos dos crioprotetores, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após a congelação e descongelação, mesmo utilizando-se curvas de resfriamento e aquecimento consideradas ótimas. Existem duas razões para justificar as falhas na ação dos crioprotetores: primeiro, a toxicidade do crioprotetor limita a concentração em que este pode ser utilizado antes do resfriamento e, portanto, limita a eficácia da ação crioprotetora (FAHY, 1990); segundo, os agentes crioprotetores podem ter ação direta na produção de crioinjúrias, como por exemplo, alterando a polaridade do meio extracelular lesando as membranas (ARNOLD et al., 1983). Diferentes estratégias estão sendo utilizadas para minimizar os danos osmóticos e tóxicos, através da aplicação de crioprotetores menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três crioprotetores (KASAI, 1996; VAJTA, 2000).

### **2.1.3. Agentes Crioprotetores**

#### **2.1.3.1. Crioprotetores Intracelulares**

Os crioprotetores intracelulares são solutos orgânicos responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento e o reaquecimento, sendo essencial na prevenção da formação de cristais de gelo, impedindo a ocorrência de danos tóxicos e osmóticos (KASAI, 2002). São moléculas com baixo peso molecular e desta maneira podem atravessar as membranas celulares com relativa facilidade. Os mais comumente utilizados são o etilenoglicol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, metanol e etanol, os quais devem ser usados com cautela devido a sua toxicidade aos embriões.

##### **- Etilenoglicol (EG)**

É quimicamente classificado como álcool, possui um baixo peso molecular (PM = 62,02) e maior permeabilidade à membrana celular, além de ser o crioprotetor intracelular de menor toxicidade, e efetivo no congelamento (MIYAMOTO e ISHIBASHI, 1978, ALI e SHELTON, 1993, MARTINEZ e MATKOVIC, 1998) e na vitrificação de embriões murinos (RALL e FAHY, 1985) bovinos (VAJTA *et al.*, 1999); VIEIRA et al., 2008), suínos (CUELLO, *et al.*, 2008).

O EG tem rápida ação através das membranas, o que determina tempos reduzidos de exposição para seu equilíbrio, além de estabilizar a membrana celular durante o processo de vitrificação (KASAI *et al.*, 1990). Essas vantagens fazem que o

EG seja um dos crioprotetores mais utilizados na formulação das soluções de vitrificação, porém, para que o EG vitrifique é necessária uma concentração de 8,0M, que é tóxica para o embrião. Dessa forma, a estratégia para o sucesso da vitrificação está na associação de crioprotetores intracelulares e extracelulares. Na prática existem diversas misturas de crioprotetores intracelulares e extracelulares que vêm sendo usados e aprimorados (DOBRINSKY, 2002; VAJTA e KUWAYAMA, 2006; VIEIRA *et al.*, 2008).

O EG é o crioprotetor mais utilizado em protocolos de vitrificação nas espécies domésticas, devido ao seu baixo peso molecular e baixa toxicidade (ALI e SHELTON, 1993, MARTINEZ e MATKOVIC, 1998). O EG tem mostrado não ser tóxico para embriões murinos e pode assim melhorar as taxas de sobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vitro* congelados e aquecidos. Altas taxas de penetração e baixa toxicidade desse crioprotetor permite a transferência direta após o aquecimento sem procedimento de diluição (SOMMERFELD e NIEMANN, 1999). O EG parece ter, além de um menor efeito tóxico, uma rápida difusão no momento do equilíbrio dentro da célula, entre a zona pelúcida e a membrana celular, e seu uso pode resultar em melhores taxas de sobrevivência de embriões congelados/descongelados. Dessa forma, a estratégia para o sucesso da vitrificação está na associação de crioprotetores intracelulares e extracelulares (ALI e SHELTON, 1993). A adição de um açúcar (sacarose, glicose, frutose, sorbitol, trealose ou rafinose) a uma solução de vitrificação baseada em EG modifica essa solução. Aditivos com alto peso molecular, como os dissacarídeos como sacarose ou trealose não penetram a membrana celular e podem reduzir significativamente a quantidade de crioprotetor requerida, bem como a toxicidade do EG, pela redução na concentração requerida para promover criopreservação bem sucedida (LIEBERMANN *et al.*, 2002).

#### **- Dimetilsulfoxido (DMSO)**

É um composto químico orgânico de fórmula  $C_2H_6SO$  peso molecular de 78 e temperatura de congelamento  $18,5^{\circ}C$  (CARPENTER, et al., 1994). A elevada capacidade higroscópica decorre da sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes do que às formadas entre moléculas de água. Isso faz com que o DMSO puro passe rapidamente para a concentração entre 66 e 67% se for deixado exposto ao ar ambiente, razão porque deve ser mantido em frasco hermeticamente fechado (ALSUP e DEBOWES, 1984).

O DMSO preserva a integridade de proteínas isoladas e das membranas lipídicas durante o processo de resfriamento e aquecimento. Essa característica faz com que seja o crioprotetor de eleição na vitrificação de células e tecidos, quando comparados a outros crioprotetores de baixo peso molecular (DE LA TORRE e STANLEY, 2007).

A solução composta por EG e DMSO tem sido amplamente utilizada, proporcionando resultados bastante satisfatórios (MEZZALIRA et al., 2004). Todavia, o emprego de DMSO apresenta como inconveniente a necessidade de preparo da solução no momento do uso, em função de sua característica higroscópica, o que dificulta sua aplicação nas rotinas de criopreservação (WERLICH et al., 2006).

#### **- Dimetilformamida (DF)**

Crioprotetor de baixo peso molecular (PM = 73,1), pertence ao grupo das amidas, potente bloqueador da toxicidade do DMSO. Sua configuração química apresenta três sítios de ligação do hidrogênio, que permite a ligação com as moléculas de água, aumentando a solubilidade e proporcionando maior permeabilidade à membrana celular e essa união com as moléculas de água proporciona um aumento na capacidade de indução do estado vítreo (BAUDOT e BOUTRON, 1998; FULLER e PAYNTER, 2004).

A dimetilformamida e dietilformamida podem ser crioprotetores eficientes, desde que não sejam tóxicos quando adicionados antes da criopreservação. Para a vitrificação completa da solução crioprotetora, a efetividade da dietilformamida e dimetilformamida é média, sendo comparável ao DMSO, todavia, é maior que a do glicerol e do EG e menor que a do 1,2 propanodiol e levo-2,3-butanodiol. Estes componentes (dietilformamida e dimetilformamida) poderiam ser crioprotetores efetivos para órgãos, dependendo de sua toxicidade química e osmótica quando adicionados para a criopreservação, também na dependência de sua toxicidade na solução suporte e na possibilidade da presença simultânea de outros crioprotetores (BAUDOT e BOUTRON, 1998).

Vários experimentos com a presença das amidas na solução crioprotetora têm revelado benefícios na criopreservação de tecidos e células, ovário de camundongo (MIGISHIMA et al., 2003) e ovários de ovinos (BAUDOT et al., 2007), embriões humano (MUKAIDA et al., 1998), bovino (FUKU et al., 1995; SIQUEIRA-PYLES, 2006).



Alvarenga et al. (2000) testaram o glicerol, EG, DMSO e DF na congelação de sêmen eqüino. Após a descongelação foi observado menor número de espermatozóides móveis e também de espermatozóides com movimento progressivo no grupo congelado com DMSO. A porcentagem de espermatozóides viáveis não diferiu entre os grupos. Foi observada melhora na motilidade quando a dimetilformamida foi utilizada. Os autores concluíram que o EG e a dimetilformamida promoveram crioproteção similar ao glicerol e foram mais eficazes na preservação de espermatozóides móveis de eqüinos do que o DMSO.

### **2.1.3.2. Crioprotetores Extracelulares**

Os crioprotetores extracelulares cujas funções são reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular, possuem alto peso molecular não podendo permear as células. Dois tipos de substância caracterizam esses crioprotetores, os polímeros e os sacarídeos. Os mais utilizados são a sacarose, glicose, lactose, trehalose, polivinilpirrolidona (PVP) e manitol (NIEMANN, 1991; DENNISTON et al., 2000).

As macromoléculas são adicionadas às soluções de vitrificação para promover modificações na viscosidade, facilitando a indução do estado vítreo. Os crioprotetores extracelulares permitem a redução da concentração dos crioprotetores intracelulares, diminuindo a toxicidade celular (KASAI e MUKAIDA, 2004). Segundo Rall (1987) a sacarose tem o efeito adicional de proteção celular, pois este crioprotetor causa desidratação em embriões de camundongo, reduzindo a quantidade de água no citoplasma da célula e desta forma, evitando a formação de gelo intracelular. Entretanto, Martinez et al. (2002) demonstraram que altas concentrações de sacarose (0,5M) resultaram em baixas taxas de nascimento para embriões de bovinos.

Existem também as macromoléculas dos bloqueadores sintéticos da formação de gelo (SIB) que protegem as membranas celulares durante a congelação, prevenindo a ocorrência do endurecimento da zona pelúcida devido à liberação prematura dos grânulos corticais (ASADA et al., 2002). Em baixas concentrações reduzem a formação de cristais de gelo nas soluções aquosas (WOWK et al, 2000). A associação de vários polímeros sintéticos foi descrita por Fahy et al. (2004) para a vitrificação de oócitos e embriões de camundongos, demonstrando excelentes resultados.

#### **2.1.4. Remoção do crioprotetor**

A remoção de crioprotetores permeáveis após o descongelamento é um problema sério porque as células são facilmente danificadas neste processo, podendo determinar uma maior ou menor taxa de sobrevivência (KASAI et al., 1990; VAJTA, 2000).

Quando as células com alta concentração intracelular de crioprotetor são colocadas em um meio sem crioprotetor, a água desloca-se para dentro das células para diluir osmoticamente o crioprotetor, de forma mais rápida que o crioprotetor leva para difundir-se para fora da célula, visto que as células são muito mais permeáveis a água do que aos crioprotetores. A solução mais comum para este problema é remover o crioprotetor lentamente em séries de etapas, a uma taxa de 3 a 10 minutos por etapa; deste modo as células incham ligeiramente, a cada passo, retornando ao tamanho normal quando as concentrações intra e extracelular do crioprotetor tornam-se iguais (SEIDEL, 1996; LIEBERMANN et al., 2003).

As técnicas de vitrificação incorporam estes procedimentos de adição e retirada em etapas dos crioprotetores, na procura de alcançar maior eficiência na sobrevivência dos embriões (LIEBERMANN et al., 2003). Vale a pena ressaltar que a exposição dos embriões às denominadas soluções de equilíbrio, onde os crioprotetores estão presentes em baixas concentrações e que conferem a proteção às estruturas celulares, usualmente não trazem prejuízos a integridade dos embriões (SHAW e JONES, 2003; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Um segundo método para a remoção do crioprotetor das células é o de colocar os embriões em um meio contendo uma alta concentração de uma molécula (crioprotetor) não-penetrante como a sacarose. Nesta situação, a tendência da água entrar na célula para diluir o crioprotetor é balanceada pela tendência da água sair da célula devido a alta concentração extracelular de sacarose. Então as células não incham, mas, encolhem após a difusão do crioprotetor para fora das células embrionárias. Isto causa um pequeno dano, entretanto, as células retornam ao tamanho original após a remoção do crioprotetor do meio com o soluto não-penetrante (SEIDEL, 1996).

O procedimento de diluição em meio suplementado com sacarose é frequentemente utilizado após o aquecimento de embriões vitrificados (VIEIRA et al., 2008; GRAVES-HERRING e BOONE, 2009; MORATÓ et al., 2008). Por outro lado, recentemente foi demonstrado que os danos osmóticos das membranas das células

embrionárias, provocados por soluções sem a presença de sacarose é mínimo (EL-GAYAR et al., 2008).

Então ao analisar as características próprias de cada crioprotetor percebe-se que, independente da capacidade individual de induzir a formação de estado vítreo, todos apresentam níveis de toxicidade. As associações de crioprotetores possuem a vantagem de reduzir a concentração de cada crioprotetor na solução, diminuindo os danos causados pela toxicidade (KASAI et al., 1990; MASSIP, 2001; VAJTA e NAGY, 2006).

### **2.1.5. Congelamento Clássico ou Lento**

Dentre as técnicas utilizadas para criopreservação de embriões, predomina o método lento, conhecido como congelamento tradicional ou clássico, no qual são necessárias de uma a duas horas para que o embrião gradativamente passe da temperatura ambiente à de estocagem (-196°C), passando por um processo de equilíbrio (VAJTA, 2000). A congelação lenta é um processo físico no qual as células embrionárias são desidratadas progressivamente através da ação de soluções crioprotetoras, provocando um decréscimo no ponto de congelação, (BARIL *et al.*, 1995), onde as taxas de resfriamento são otimizadas para remover água do embrião, limitando assim a formação de cristais de gelo intracelular, minimizando a toxicidade química e o “stress” osmótico (CAMPOS-CUILLON et al., 2006). Métodos de resfriamento lento permitem um intercâmbio entre a solução intracelular e compartimentos extracelulares sem causar sérios efeitos osmóticos (VAJTA e KUWAYAMA, 2006). O sucesso do congelamento lento depende em atingir o equilíbrio ideal entre a velocidade com que a água pode deixar as células e a velocidade com que é convertido em gelo (VISINTIN et al., 2002)

As técnicas de criopreservação envolvem: adição de crioprotetor, congelação do embrião com indução da cristalização e estocagem em nitrogênio líquido, descongelação do embrião e remoção do crioprotetor. Estes métodos envolvem a penetração do crioprotetor em temperatura ambiente e a desidratação dos embriões durante o processo de resfriamento e congelação, antes da imersão em nitrogênio líquido (FAHNING e GARCIA, 1992).

O objetivo é retirar o máximo de água possível do embrião e, assim, prevenir a formação de gelo intracelular, enquanto o citoplasma super-resfria antes de congelar. A

indução da cristalização (“seeding”), que é feita tocando uma coluna da solução com instrumento super resfriado, onde induz a mudança do estado da água para o gelo, o que leva a um aumento da concentração de sais na solução. Uma vez que o gelo se forma, os embriões congelam lentamente, permitindo a eles mudança de concentrações osmóticas (FAHNING e GARCIA, 1992).

A velocidade lenta de resfriamento empregada visa manter o delicado balanço entre vários fatores que podem causar danos como a formação de cristais de gelo, injúrias osmóticas, efeito tóxico dos crioprotetores, concentração intracelular de eletrólitos, injúrias do resfriamento, fratura da zona pelúcida e de embrião e alterações de organelas intracelulares, citoesqueleto e contatos célula-célula (VAJTA, 2000).

A maioria dos embriões mamíferos são criopreservados através do método de congelamento lento, usando crioprotetores permeáveis, com baixas taxas de resfriamento e altas taxas de aquecimento. O congelamento clássico segue os seguintes passos: **1.** Exposição dos embriões aos crioprotetores de baixo peso molecular, até atingir o equilíbrio entre a solução e o embrião; **2.** Indução da cristalização a temperatura de  $-5^{\circ}$  a  $-7^{\circ}$ ; **3.** Resfriamento lento controlado ( $0,2$  a  $2,0$   $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ), até  $-30^{\circ}$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ ; **4.** Imersão dos embriões no nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ); **5.** Aquecimento controlado a uma velocidade de  $250^{\circ}\text{C}/\text{min}$  em banho maria; **6.** Remoção do crioprotetor a temperatura ambiente para posterior inovulação ou cultivo (PALASZ e MAPLETOFT, 1996; VISINTIN et al., 2002, ; CAMPOS-CHILLON et al., 2006; MUCCI et al., 2006).

Embora os índices obtidos sejam aceitáveis e difíceis de superar em embriões transferidos a fresco (VAJTA, 2000), existem limitações do emprego desta técnica, como o custo do equipamento e a demora do processo (BARIL et al., 2001; CAMPOS-CHILLON, 2006; SEIDEL, 2006).

### **2.1.6. VITRIFICAÇÃO**

O fenômeno da vitrificação foi primeiramente investigado por Luyet (1937), o qual observou o potencial de certos crioprotetores em solidificarem sem a formação de cristais de gelo. Durante os primeiros estudos não estava claro como o procedimento de vitrificação poderia ser estabelecido. A vitrificação requer taxa muito alta de resfriamento e ao mesmo tempo proteção de substâncias potencialmente tóxicas, o que inicialmente levou a uma substituição deste por métodos outros de criopreservação.

Rall e Fahy (1985) introduziram a vitrificação como método para criopreservar embriões de mamíferos na ausência de gelo. Esta técnica reduz a necessidade de equipamentos e diminui o custo e o tempo por embrião transferido (DOBRINSKY, 2002).

A vitrificação é a solidificação de uma solução em baixas temperaturas sem a formação de cristais de gelo (VAJTA, 2000). O fenômeno é obtido com o aumento extremo da viscosidade que requer grande velocidade de resfriamento e o uso de soluções crioprotetoras que impeçam a formação de cristais de gelo. A viscosidade da amostra começa a aumentar até que as moléculas iniciem a imobilização tornando a amostra não mais um líquido, porém, com propriedades de um sólido. Contudo, a vitrificação é resultado de altas taxas de resfriamento associadas com altas concentrações de crioprotetores. Isso pode ser conseguido através do aumento da viscosidade da solução associado à alta velocidade de resfriamento e aquecimento (LIEBERMANN et al., 2003; KASAI e MUKAIDA, 2004).

Em criobiologia, o termo vitrificação se refere ao processo onde a solução inteira que contém a amostra biológica é vitrificada completamente. O sucesso da vitrificação está relacionado com a capacidade de permeabilidade, concentração, tempo de exposição e volume do crioprotetor, que devem ser adequados para impedir a formação de cristais de gelo intracelular sem provocar lesões de efeito osmótico ou tóxico (RALL e FAHY, 1985).

Um dos fatores que limita o sucesso na congelação de embriões é a ocorrência de injúrias causadas pelo abaixamento da temperatura durante o processo. Estas injúrias resultam em danos irreversíveis à membrana plasmática. A técnica de vitrificação tem como objetivo prevenir danos causados pelo frio por evitar a formação de cristais de gelo. A vitrificação de ovócitos tem sido bem sucedida em várias espécies de mamíferos incluindo ratos, bovinos e humanos (CETIN e BASTAN, 2006).

A estratégia da vitrificação é diferente da congelação lenta ou tradicional, uma vez que na congelação lenta a taxa de resfriamento possibilita manter um equilíbrio entre os vários fatores que podem resultar em injúrias, como a formação de cristais de gelo, fratura da zona, alterações de organelas intracelulares e do citoesqueleto (MASSIP, 1989; DOBRINSKY, 1996; MARTINO, 1996 a; SAHA et al., 1996; KASAI, 1997). Na vitrificação, elimina-se totalmente a formação de cristais de gelo intracelulares, porém, é mais radical e como consequência negativa do processo, existe uma grande probabilidade de ocorrer quase todos os danos da congelação,

principalmente os tóxicos e osmóticos. A redução da concentração do crioprotetor pode ser obtida através do uso adicional de polímeros não permeáveis, que permanecem na área extracelular. A minimização da toxicidade do crioprotetor também pode ser conseguida pelo uso de uma combinação de dois crioprotetores e exposição em dois passos das células às soluções de criopreservação (LIEBERMANN et al., 2002b; FAHY, 1984; RALL, 1987; KASAI, 1990; MASSIP et al., 1995; PALASZ, 1996). Por outro lado, a alta velocidade de resfriamento e aquecimento resulta em rápida passagem através da temperatura crítica, o que minimiza os danos causados pelo resfriamento (LIEBERMANN et al., 2002a), pois o aumento da velocidade de resfriamento reduz os danos produzidos pelas gotas lipídicas intracelulares, principalmente as contidas nas membranas e no citoesqueleto, por atravessar mais rapidamente as faixas críticas de temperatura (DOBRINSKY, 1996; MARTINO, 1996 b; ISACHENKO, 1998; ZERON, 1999).

As soluções de vitrificação, assim como aquelas utilizadas para a congelação lenta contêm um crioprotetor, vários sais e, normalmente, uma ou mais macromoléculas. No caso da vitrificação, as macromoléculas parecem ser especialmente importantes, uma vez que nestas soluções, a concentração do crioprotetor é muito alta e as macromoléculas modificam o crioprotetor durante o processo de vitrificação (SIQUEIRA-PYLES, 2006).

Durante os últimos anos diversas técnicas de vitrificação vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de evitar as crioinjúrias, aumentando as taxas de resfriamento e aquecimento. A vitrificação é uma técnica relativamente nova e não foi padronizada, existindo até o momento, diversos protocolos que apresentam diferentes detalhes técnicos, e que os resultados ainda são inconsistentes (LIEBERMANN et al., 2002). Concomitante, inúmeros agentes crioprotetores vêm sendo utilizados em diferentes concentrações e combinações, sendo adicionados às soluções em um único passo, ou paulatinamente, e mergulhados diretamente em nitrogênio líquido a partir da temperatura ambiente (DATTENA et al., 2004).

Um dos papéis dos crioprotetores consiste em aumentar a viscosidade dos meios biológicos, no entanto, as concentrações empregadas nos métodos clássicos de congelamento de embriões, são geralmente ineficientes para que se obtenha o estado vítreo, pelo menos no exterior das células (MASSIP et al., 1986).

Rall (1984) descreveu alguns fatores críticos para a alta sobrevivência embrionária após a vitrificação, como por exemplo, a solução de vitrificação deve ser

suficientemente concentrada para vitrificar à velocidade de resfriamento praticáveis e não deve produzir toxidez química ou osmótica durante o equilíbrio e diluição. O procedimento para o equilíbrio deve proporcionar um citoplasma desidratado que vitrifique ao resfriamento. A velocidade de resfriamento é relativamente irrelevante, desde que seja rápida para prevenir a cristalização. A temperatura de estocagem das suspensões de embriões vitrificados deve estar abaixo da temperatura de transição vítrea da solução. O descongelamento deve ser suficientemente rápido para prevenir a desvitrificação (cristalização) e o excessivo aumento de volume celular deve ser evitado quando os embriões são diluídos e retornam às condições fisiológicas normais.

Para evitar o aumento osmótico durante a diluição dos embriões vitrificados, deve ser adicionado um soluto impermeável, tal como a sacarose no meio de diluição. A injúria observada após a exposição de embriões às soluções altamente concentradas de crioprotetores pode, em alguns casos, ser devido às condições impróprias de diluição e não à toxidez química por si (RALL, 1986).

Outra maneira de tentar minimizar os danos que as altas concentrações de crioprotetores podem causar é fazer a exposição em duas etapas. O primeiro passo é feito com soluções menos concentradas para conseguir o equilíbrio entre os fluídos extra e intracelulares. O segundo passo é feito com soluções concentradas e tempos de exposição relativamente curtos, acompanhados pelo encolhimento do embrião e aumento de concentração de macromoléculas e de eletrólitos intracelulares (VAJTA, 1997).

Nos protocolos de vitrificação, diferentes combinações crioprotetoras foram empregadas nos últimos anos com resultados, muitas vezes, contraditórios em função do emprego de diferentes procedimentos de exposições, tipos de suporte e velocidade de resfriamento. Dentre as soluções correntemente empregadas, o uso de EG de forma isolada ou associada a outros crioprotetores não permeáveis tem sido a solução mais comumente utilizada (HOCHI et al., 1996; MARTINO et al., 1996b; VAJTA et al., 1996). Um agente crioprotetor não permeável comum é a sacarose, a qual exerce um efeito osmótico significativo, sendo, portanto empregada na re-hidratação, após a descongelação. Diversas observações confirmam o efeito estabilizante da adição de sacarose na solução de vitrificação. Na presença de sacarose, a estabilidade da membrana dos ovócitos é sensivelmente aumentada após exposição prolongada à altas concentrações de EG (SZELL e SHELTON, 1986; TODOROV et al., 1993; RAYOS et al., 1994).

Considerando-se que na vitrificação existe um risco considerável de toxicidade atribuída à alta concentração de crioprotetores utilizados, o estágio de desenvolvimento embrionário, no momento da criopreservação, tem demonstrado importância crítica para a sobrevivência do embrião após aquecimento. O EG tem mostrado não ser tóxico para embriões murinos e pode melhorar as taxas de sobrevivência de embriões bovinos produzidos *in vitro* congelados e aquecidos. A alta taxa de penetração e a baixa toxicidade desse crioprotetor permite a transferência direta após o aquecimento sem o procedimento de diluição. O EG tem sido utilizado com sucesso na concentração de 1,5 a 1,8M para a congelação lenta de embriões bovinos produzidos *in vivo* (SOMMERFELD e NIEMANN, 1999).

Comparada ao congelamento, a vitrificação pode melhorar a capacidade de desenvolvimento dos embriões após o descongelamento. Entretanto, em alguns casos, a alta taxa de resfriamento e a alta concentração de crioprotetores alteram o arranjo dos cromossomos e microtúbulos em oócitos de camundongos (COOPER et al., 1998).

Comparações entre a congelação lenta e a vitrificação têm mostrado diferentes resultados, embora pareça que a vitrificação seja mais adequada para embriões produzidos *in vitro* (MUCCI et al., 2005). Nedambale et al., (2004), ao compararem a congelação controlada com a vitrificação, concluíram que a vitrificação apresentou melhores índices de sobrevivência embrionária *in vitro* para embriões produzidos em sistemas de cultivo sequencial de KSOM-SOF.

A maioria das pesquisas que compara a congelação lenta e a vitrificação apresenta resultados semelhantes de sobrevivência embrionária *in vivo* e *in vitro* ou ainda a vitrificação apresenta melhores resultados (VAJTA, 2000).

Existe uma questão a ser observada quando se estuda a vitrificação de embriões, que são as soluções crioprotetoras e os diferentes recipientes que vêm sendo empregados, dificultando o estabelecimento de um único protocolo. Entretanto, os relatos de prenhez após a vitrificação de embriões encorajam os estudos desta técnica (LIEBERMANN, et al., 2002).

Embriões ovinos vêm sendo vitrificados com sucesso. Isachenko et al. (2003a) obtiveram 70 % de prenhez em ovelhas inovuladas com embriões vitrificados em OPS, similar a embriões congelados pelo método tradicional. Porém, Papadopoulos et al. (2002) obtiveram taxas de gestação menores (50%) com embriões vitrificados quando comparados a embriões inovulados a fresco (90%). Mermillod et al. (1999) mostraram taxas de parição similares entre embriões ovinos vitrificados e a fresco transferidos pelo



método indireto (50% e 60%, respectivamente). Em estudo realizado no Brasil em ovinos da raça Santa Inês não foi observada diferença significativa entre a viabilidade dos embriões congelados e vitrificados, porém os resultados foram considerados baixos, sendo a taxa de fertilidade aos 60 dias de 18,2% com embriões congelados e 6,7% com embriões vitrificados (CORDEIRO, 2001). No entanto, Martinez et al. (2006) na Argentina obtiveram resultados animadores e estatisticamente semelhantes quanto a taxa de gestação aos 30 dias de embriões vitrificados (41,1%) e congelados (46,4%).

As vantagens da técnica de vitrificação, quando comparada ao congelamento, são baixo custo do equipamento, simplicidade do procedimento e o pouco tempo necessário para realizar o processo, além da vitrificação melhorar a capacidade de desenvolvimento dos embriões após o descongelamento (SIQUEIRA-PYLES, 2006).

Resultados animadores na vitrificação de embriões com a utilização desta técnica têm sido relatados por alguns autores. Dattena et al. (2000) obtiveram de 62 embriões colhidos e vitrificados, 52 (83,8%) com re-expansão da blastocela após cultivo por 24 horas e 39 cordeiros nascidos (62,9%). Baril et al. (2001) relataram taxa de prenhez e de sobrevivência embrionária depois da inovulação de embriões vitrificados de 72 e 50%, respectivamente.

### **2.1.7. Recipientes para envase dos embriões**

Há muitos dispositivos de armazenamento disponíveis para que permitam o armazenamento de embriões em pequenos volumes. Os métodos de vitrificação têm sido muito criativos na redução de volumes, utilizando-se muitas opções.

A técnica de vitrificação utilizando-se palhetas francesas de 0,25 mL, sendo preenchidas com duas colunas de 160 $\mu$ L solução de sacarose, seguidas de 20 $\mu$ L solução de vitrificação e 20 $\mu$ L meio contendo embriões. Todas as colunas são separadas por 60 $\mu$ L de ar. Após serem seladas, as palhetas são imersas em nitrogênio líquido (NAITANA et al., 1997).

A taxa de resfriamento para este processo de vitrificação é de aproximadamente 2.500°C/min (PALASZ e MAPLETOFT, 1996). Por outro lado, para evitar fraturas de embriões e de zona pelúcida nestas taxas de resfriamento, requer-se o uso de altíssimas concentrações de crioprotetores, muito maiores do que as requeridas para o

congelamento tradicional, sendo considerada de alta toxicidade aos embriões (KASAI, 1997).

A técnica denominada Open Pulled Straw (OPS) foi desenvolvida originalmente para embriões bovinos por Vajta et al. (1997). As palhetas de OPS foram desenvolvidas através das palhetas francesas de 0,25ml, sendo os tampões de algodão removidos e estas amolecidas por aquecimento em sua região central. Manualmente, as palhetas foram esticadas até que o diâmetro interno e a espessura da parede diminuíssem para aproximadamente metade do tamanho original. Posteriormente foram resfriadas ao ar e cortadas na extremidade estreita. Aproximadamente 1 a 2 $\mu$ L do meio de vitrificação contendo o embrião é introduzido na extremidade estreita da palheta através do efeito capilar simples. A extremidade contendo o embrião é imediatamente imersa no nitrogênio líquido, solidificando a coluna líquida sem que haja dispersão da solução (VAJTA et al., 1998).

A taxa de resfriamento é aumentada em oito vezes quando comparada as palhetas francesas de 0,25mL, sendo acima de 20.000°C/min. Estas taxas de resfriamento são alcançadas devido à redução do volume das soluções e a diminuição da espessura da parede da palheta (0,07mm). Dessa forma, os altos padrões de resfriamento e aquecimento resultam em diminuição das crioinjúrias, como fraturas da zona pelúcida e do embrião. Adicionalmente, com o uso das palhetas de OPS é possível alcançar a vitrificação da solução utilizando uma menor concentração de crioprotetor, juntamente com o rápido resfriamento, minimizando as injúrias tóxicas e osmóticas (VAJTA et al., 1998).

Técnicas como o tamanho mínimo da gota (ARAV, 1992; LANDA e TEPLA, 1990) e as grades de microscopia eletrônica (MARTINO et al., 1996b; SON et al., 2003), vem proporcionando novas ferramentas que permitem a utilização de volumes menores ao mesmo tempo que aceleram a velocidade de resfriamento.

Diferentes tipos de envase associados a sistemas de armazenamento foram descritos com os objetivos de primeiro atingir maiores velocidades de resfriamento e segundo evitar contaminações provenientes do nitrogênio líquido, como o Cryoloop, Lane et al., (1999) descreveram um sistema fechado, que consiste de uma alça de fibra sintética (nylon curvado de 20 $\mu$ m de comprimento e 0,5 mm de largura), adaptado a um tubo de aço o qual é inserido na tampa de um criotubo. O sistema da mini palheta (mini straws) (VANDERWALMEN et al., 2000), meia palhetas (hemi straws)

(LIEBERMANN et al., 2002b; VANDERWALMEN et al., 2003), a palheta esticada fechada (closed-pulled straws – CPS) (CHEN et al., 2001).

Outros autores continuaram na procura de envases de volume mínimo baseados na redução dos diâmetros, como os envases de ponteiras de gel (gel loading pipet tips) (TOMINAGA e HAMADA , 2001; NIASARI-NASLAJI et al., 2007) , a flexipet denuding pipets (FDP) (ISACHENKO et al., 2003b), a fine diameter plastic micropipette (CREMADES et al., 2004), a ponteira de pipeta de 100µl (HREDZAK et al., 2005), o cryotip e cryotop (KUWAYAMA et al., 2005; MORATÓ et al., 2008) e malha metálica (FUJINO et al., 2008).

Uma preocupação para o armazenamento de embriões vitrificados é o nitrogênio líquido, como uma possível fonte viral de contaminação, uma vez que os embriões entram em contato direto com o nitrogênio líquido. Bielanski et al. (2000) e Bielanski et al. (2003) quantificaram o potencial da transmissão de vírus em amostras de embriões vitrificados em amostras abertas e fechados. Mostraram que 21% dos embriões foram contaminados com o vírus quando armazenado em nitrogênio líquido contaminado e em envases abertos e 0% nos sistemas fechados.

### **2.1.8. Inovulação**

O sucesso da transferência de embriões depende, dentre outros fatores, do grau de sincronia do estro e da ovulação entre doadora e receptora. Em cabras, o grau de sincronia entre doadoras e receptoras parece ser menos crítico do que em ovinos, podendo as receptoras apresentarem diferença de  $\pm 48$  horas em relação às doadoras (ANDRIOLI, 1993).

A inovulação, a qual consiste na deposição do embrião no útero da receptora, pode ser realizado por laparotomia, laparoscopia, semi-laparoscopia e por via transcervical.

A sobrevivência embrionária pós-inovulação é influenciada dentre outros fatores, pela condição corporal e taxa de ovulação das receptoras, pelo número de embriões inovulados por receptoras, pelo estágio de desenvolvimento dos embriões, pelo local de inovulação e pelo sincronismo entre o estágio fisiológico da doadora com o da receptora (ARMSTRONG e EVANS, 1983; TERVIT et al., 1986; ASHWORTH, 1995).

Em caprinos, a inovulação de dois embriões por receptora aumenta as taxas de sobrevivência e parição, além de reduzir o número de receptoras (ARMSTRONG et al.,

1982; MAHMOOD et al., 1991). Contrariamente, Stefani et al. (1990) não observaram, em ovinos diferença significativa entre a inovulação de um ou dois embriões por receptora. Segundo Armstrong et al. (1983), a taxa de sobrevivência dos embriões é maior se transferidos para o mesmo oviduto e também quanto maior o número de corpos lúteos presentes nos ovários da receptora,.

A inovulação na fêmea caprina deve ser feita com embriões em estádios de mórula e de blastocisto considerando-se que exista uma sincronia não superior a 24 horas entre o estágio de desenvolvimento dos embriões e o dia do ciclo estral da receptora. Em estado fresco e mantido em condições ambiente o embrião deve ser transferido, preferencialmente no período de duas horas em relação ao momento da colheita e quando criopreservado, imediatamente após a descongelação (SALLES et al., 2002; SIMPLÍCIO et al, 2002).

#### **2.1.9. Análise da qualidade embrionária**

A avaliação morfológica dos embriões estabelece padrões que avaliam a forma, mas não a viabilidade do embrião. Os principais parâmetros observados considerados para avaliação da qualidade são tamanho, formato, simetria, coloração, homogeneidade do citoplasma, forma e integridade da zona pelúcida. Considerando os parâmetros descritos, os embriões recebem uma classificação segundo a IETS, onde classifica os embriões segundo sua qualidade. A tabela 1 descreve a classificação dos embriões.

Tabela 1- Qualidade embrionária e suas características

<i>Qualidade embrionária</i>	<i>Características</i>
Embrião Grau I (Excelente ou bom)	Massa embrionária simétrica e esférica; blastômeros são uniformes em tamanho, cor e densidade; irregularidade devem ser relativamente menores, cerca de 85% do material celular deve ser de massa embrionária viável intacta.
Embrião Grau II (Regular)	Moderadas irregularidades na forma geral da massa embrionária ou tamanho, cor e densidade das células individuais, cerca de 50% do material celular deve compor uma massa embrionária viável e intacta.
Embrião Grau III (Pobre)	Maiores irregularidades na forma embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais, menos de 25% do material celular devem formar a massa embrionária viável e intacta.
Embrião Grau IV (Morto ou degenerado)	Não apresenta uma forma definida, sendo impossível determinar o estágio de desenvolvimento.

A análise dos embriões é importante para o sucesso dos programas de transferência de embriões (HOSHI, 2003). O estágio de desenvolvimento embrionário é considerado um fator crítico para a viabilidade do embrião após a criopreservação (LEIBO et al., 1996).

Diversos estudos sobre o efeito do estágio de desenvolvimento embrionário na taxa de sobrevivência dos embriões foi conduzido comparando-se mórula e blastocisto devido à complexidade da colheita de embriões em estágios iniciais *in vivo* (MASSIP, 2001).

Estudo feito por Garcia-Garcia et al. (2006) demonstraram a habilidade dos embriões em sobreviverem aos processos de congelamento e descongelamento em diversos

estágios de desenvolvimento. A taxa de sobrevivência embrionária variou de 17,1% a 31,4% em embriões congelados em estágios iniciais de desenvolvimento (2 a 12 células), em contrapartida, obtiveram uma maior sobrevivência dos embriões em estágio de mórula inicial, mórula e blastocisto (40,5%, 46,3% e 83,7%, respectivamente). Este estudo indica que embriões em estágios iniciais são mais sensíveis ao processo de congelamento e que a taxa de sobrevivência embrionária a criopreservação aumenta com o crescimento progressivo do embrião, com uma diferença substancial entre mórula e blastocisto.

Embora a avaliação morfológica dos embriões seja útil para prever os índices de prenhez, não é tão eficiente para prever a sobrevivência embrionária individualmente (HOSHI, 2003) e, nem mesmo, é uma maneira eficiente de prognosticar a habilidade destes embriões em originarem crias saudáveis (RUSSELL et al., 2006). Há embriões classificados morfológicamente como de qualidade ruim que conseguem resultar em prenhez, enquanto que embriões classificados como de qualidade excelente não resultam em prenhez. Estes relatos sugerem que, além da avaliação morfológica, é necessário encontrar uma maneira mais precisa para avaliar a viabilidade embrionária (HOSHI, 2003; RUSSELL et al., 2006).

Em estudos mais recentes, quando a relação entre a morfologia embrionária, a ultra-estrutura, o uso de sondas fluorescentes, a expressão gênica e a criotolerância vem sendo feita, muito tem sido atribuído à análise morfológica dos embriões, trazendo novamente a atenção dos pesquisadores para os aspectos morfológicos (NICÁCIO, 2008).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGCA, Y.; MONSON, R.L.; NORTHEY, D.L.; MAZNI, O.A.; SCHAEFER, D.M.; RUTLEDGE, J.J. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: Normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*, 1998:50:147-62.

ALBARRACÍN, J.L.; MORATÓ, R.; ROJAS, C., et al. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology*, v.63, p.890-901, 2005.

AL-HASANI, S.; DIEDRICH, K. Oocyte storage. In: GRUDZINKAS J.G.; YOVICH, J.L. (Eds.). **Gametes: the oocyte**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p.376-395.

ALI, J.; SHELTON, J.N. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 99, p. 471-477, 1993.

ALSUP, E.M., DEBOWES, R.M. Dimethyl sulfoxide. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.185, 1011-1014, 1984.

ALVARENGA, M.A.; GRAHAM, J.K.; KEITH, S.L., et al. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION**, 2., 2000, Stockholm. *Proceedings...* Stockholm, 2000. p.1729.

ANDRIOLI, P. A. Métodos de colheita e de inovulação de embriões caprinos (*Capra Hircus*, Linnaeus, 1758) e os efeitos de repetidas colheitas na vida reprodutiva de doadoras. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993, 102p.

ARAV, A. Vitrification of oocytes and embryos. In: LAURIA, A., GANDOLFI, F. (Eds), **Embryonic Development and Manipulation in Animal Production**. Portland Press, London and Chapel Hill. Cap.22, p. 255-264, 1992.

ARNOLD, K.; PRATSCH, L.; GAWRISH, K. Effect of poly (ethylene Glicol) in phospholipid hydration and polarity of the external phase. *Biochemica et Biophysica Acta*, v.782, p.121-128, 1983.

ARMSTRONG, D. T.; PFITZNER, A. P.; SEAMARK, R. F. Ovarian responses and embryo survival in goats following superovulation and embryo transfer. *Theriogenology*, v. 17, p. 76, 1982.

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, v. 19, p. 31-42, 1983.

ARMSTRONG, D. T.; PFITZNER, A. P.; WARNES, G. M.; SEAMARK, R. F. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 67, p. 403-410, 1983.

ASADA, M.; ISHIBASHI, S.; IKUMI, S., et al. Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v.58, p.1199-1208, 2002.

ASHWORTH, C. J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. **Livestock Production Science**, v. 44, p. 99-105, 1995.

BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. **Manual de Formación Práctica para el Transplante de Embriones en Ovejas y Cabras**. Roma. FAO, 1995. 175p.

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

BAUDOT A.; BOUTRON, P. Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide. **Cryobiology**, v.37, p.187- 199, 1998.

BAUDOT, A.; COURBIERE, B.; ODAGESCU, V.; SALLE, B.; MAZOYER, C.; MASSARDIER, J.; LOMAGE, J. Towards whole sheep ovary cryopreservation. **Cryobiology**, v.55. p. 236-248, 2007.

BIELANSKI, A.; NADIN-DAVIS, S.; SAPP, T.; LUTZE-WALLACE, C. Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 40, p.110-116, 2000.

BIELANSKI, A; BERGERON, H.; LAU, P. C. K.; DEVENISH, J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v.46, p. 146-152, 2003.

CAMPOS –CHILLON, L.F.; WALKER, D.J. de TORRE- SANCHEZ, J.F.; SEIDEL, G.E. Jr. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 1200-1214, 2006.

CARPENTER, R.J., ANGEL, M.F., MORGAN, R.F. Dimethyl sulfoxide increases the survival of primarily ischemic island skin flaps. **Otolaring. Head Neck Surgery**. v.110, p. 228-231, 1994.

CETIN, Y.; BASTAN, A. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification on straws. **Animal Reproduction Science**., v.92, p.29-36, 2006.

CHEN, S.; LIEN, Y.; CHENG, Y.; CHEN, H.; HO,H.; YANG,Y. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with convention straws, open pulled straws (OPS) and grids. **Human Reproduction**, v.16, p. 2350-2356, 2001.

CORDEIRO, M. F. **Produção e criopreservação de embriões ovinos da raça Santa Inês**. 2001, 60p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.



COOPER, A.; PAYNTER, S.J.; FULLER, B.J. et al. Differential effects of cryopreservation on nuclear or cytoplasmic maturation *in vitro* in immature mouse oocytes from stimulated ovaries. **Human Reproduction**, v.13, n.4, p.971-978, 1998.

CREMADES, N.; SOUSA, M.; SILVA, J.; VIANA, P.; SOUSA, S.; OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA DA SILVA, J.; BARROS, A. Experimental vitrification of human compacted morulae and early blastocysts using fine diameter plastic micropipettes. **Human Reproduction**, v. 19, p. 300-305, 2004.

CUELLO, C.; SANCHEZ-OSORIO, J.; ALMIÑANA, C.; GIL, M. A.; PERALS, M. L.; LUCAS, X.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E.A. Effect of the cryoprotectant concentration on the *in vitro* embryo development and cell proliferation of OPS-vitrified porcine blastocysts. **Cryobiology**, v. 56, p. 189-194, 2008.

DATTENA, M. et al. Survival and viability of vitrified *in vitro* and *in vivo* produced ovine blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1511-1519, 2000.

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

DE LA TORRE, J. C.; STANLEY, W.J. Pharmacology of dimethyl sulfoxide: an update. **Cryobiology**, v.55, p. 351, 2007.

DENNISTON, R. et al. Principles of cryopreservation. In: TIERSCH, T.R.; MAZIK, P.M. **Cryopreservation in aquatic species. World Aquaculture Society**. 2000, p.59-74.

DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v. 45, p.17-26, 1996.

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

EL-GAYAR, M.; GAULY, M.; HOLTZ, W. One step dilution of open-pulled-straw (OPS) vitrified mouse blastocysts in sucrose-free medium. **Cryobiology**, v.57, p. 191-194, 2008.

FAHNING, M. L.; GARCIA, M. A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. **Cryobiology**, v. 29, p. 1-18, 1992.

FAHY, G. M. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, p.407-426, 1984.

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

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINDELL, H., et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v.27, p.247-268, 1990.

FAHY, G.M.; WOWK, B.; PAYNTER, S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. **Cryobiology**, v.48, p.22-35, 2004.

FISCHER, L.D.; BELLE, G.V. **Biostatistics: a methodology for the Health Sciences**. New York: Wiley-Interscience. 1993. 991p.

FUJINO, Y.; KOJIMA, T.; NAKAMURA, H.; KOBAYASHI, K.; FUNAHASHI, H. Metal mesh vitrification (MMV) method for cryopreservation of porcine embryos. **Theriogenology**, v.70, p. 809-817, 2008.

FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.32, p.139-156, 1995.

FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive BioMedicine Online**, v.9, p. 680-691, 2004.

GARCIA-GARCIA, R.M.; GONZALEZ-BULNES, A.; DOMINGUEZ, V.; VEIGALopez, A.; COCERO, M.J. Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. **Cryobiology**, v. 52, p. 108-113, 2006.

GRAVES-HERRING, J.E.; BOONE, W. R. Blastocyst rate and live births from vitrification and slow-cooled two-cell mouse embryos. **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 920-924, 2009.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p. 675-685, 2003.

HOCHI, S.; KOZAWA, M.; FUJIMOTO, T., et al. In vitro maturation and transmission electron microscope observation of horse oocytes after vitrification. **Cryobiology**, v.33, p.300-310, 1996.

HOCHI, S.; AKIYAMA, M.; MINAGAWA, G., et al. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of in vitro matured bovine oocytes. **Cryobiology**, v.41, p.69-73, 2001.

HREDZÁK, R.; OSTRÓ, A.; MARACEK, I.; KACMÁRIK, J.; ZDILOVÁ, V.; VESELÁ, J. Influence of slow-rate freezing and vitrification on mouse embryos. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 74, p. 23-27, 2005.

ISACHENKO, V. Vitricação of immature porcine oocytes: effects of lipiddroplets, temperature, cytoskeleton and addition and removal of cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 36, p. 250-253, 1998.

ISACHENKO, V.; ALABART J.L.; DATTENA M.; NAWROTH, F.; CAPPAL P.; ISACHENKO, E.; COCERO, 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, 2003a.

ISACHENKO, V.; FOLCH, J.; ISACHENKO, E.; NAWROTH, F.; KRIVOKHARCHENKO, A.; VAJTA, G.; DATTENA, M.; ALABART, J.L. Double vitrification of rat embryos at different developmental stage using an identical protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 445-452, 2003b.

JONDET, M.; DOMINIQUE, S.; SCHOLLER, R. Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte. **Cryobiology**, v.21, p.192-199, 1984.

KASAI, M.; KOMI, J.H.; TAKAKAMO, A.; TSUDERA, H.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. A simple method for mouse embryos cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.89, p.90-97, 1990.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 67-75, 1996.

KASAI, M. Cryopreservation of mammalian embryos. **Molecular Biotechnology**, v. 7, p. 173-179, 1997.

KASAI, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. **Reproductive Medicine and Biology**, v.1, p.1-9, 2002.

KASAI, M.; MUKAIDA, T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v.9, p164-170, 2004.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; LADA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, p. 608-614, 2005.

LANDA, M.; TEPLA, O. Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. **Folia Biol (Praha)**, v. 36, p. 153-158, 1990.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W. B.; AND GARDNER, D. K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop containerless technique. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 5, p. 1073-1078, 1999.

LEGAL, F.; GASQUI, P.; RENARD, J. Differential osmotic behavior of mammalian oocytes before and after maturation: a quantitative analysis using goat oocytes as a model. **Cryobiology**, v.31, p.154-170, 1994.

LEHN-JENSEN, H. Deep freezing of cattle embryos. In: **INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION**, 10. 1984, Illinois. *Proceedings...* Illinois, 1984. p.1-12.

LEIBO, S.P. Fundamental cryobiology of mouse ova and embryos. In: **CIBA FOUNDATION**. The freezing of mammalian embryos. Amsterdam, 1977. p.69-96. (Symposium, 52).

LEIBO, S.P. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 21, p. 767-790, 1984.

LEIBO, S.P.; MARTINO, A.; KOBAYASHI, S.; POLLARD, J.W. Stage dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 43-53, 1996.

LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M.J. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1671-1680, 2002.

LIEBERMANN, J.; TUCKER, M.J.; GRAHAM, J. R. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. **Reproductive BioMedicine Online**, v.4, p. 146-150, 2002b.

LIEBERMANN, J.; DIETL, J.; VANDERZWALMEN, P.; TUCKER, M. Recent developments in human oocyte, embryo and blastocyst vitrification: where are we now? **Reproductive BioMedicine Online**, v.7,p. 623-633, 2003.

LUYET, B. The vitrification of organic colloids and protoplasm. **Biodynamica**, v.1, p. 1-14, 1937.

MAHMOOD, S.; KOUL, G. L.; BISWAS, J. C. Comparative efficacy of FSH-P and PMSG on superovulation in Pashmina goats. **Theriogenology**, v. 35, p. 1191-1196, 1991.

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

MARTINEZ, A.G., MATKOVIC, M. Cryopreservation of ovine embryos: Flow freezing and vitrification. **Theriogenology**, v. 49, p. 1039-1049, 1998.

MARTINEZ, A.G., VALCÁRCEL, A., de las HERAS, M.A., de MATOS, D.G., et al. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. **Animal Reproduction Science**, v. 73, p. 11-21, 2002.

MARTINEZ, A.G.; VALCARCEL, A.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; IORIO, G.; DE LAS HERAS, M.A. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. **Small Rum. Res.**, v. 63, p. 288-296, 2006.

MARTINO, A.; POLLARD, J.W.; LEIBO, S. P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.503-512, 1996a.

MARTINO, A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1059-1069, 1996b.

MASSIP, A.; Van Der ZWALMAN, B.; SCHEFFEN, F. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Lett.*, v.7, p.270-273, 1986.

MASSIP, A. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 117-129, 1989.

MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; DINNYES, A. Morphology and biochemistry of in vitro-produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Hum. Reprod.*, v.10, p.3004-3011, 1995.

MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; DINNYÉS, A. Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 36, p. 49-55, 2001.

MASSIP, A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v.36, p. 49-55, 2001.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v.199, p.939-949, 1970.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v. 115, p.251-272, 1977.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos. In: **INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION**, 9. 1980, Madrid. *Proceedings...* Madrid, 1980. p.99-114.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology**, v.247,p.125-142, 1984

McGANN, L.E. Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotecture agents. **Cryobiology**, v.15, p.382-390, 1978.

MEN, H.; MONSON, R.L.; PARRISH, J.J., et al. Degeneration of cryopreserved bovine oocytes via apoptosis during subsequent culture. **Cryobiology**, v.47, p.73-81, 2003.

NEDAMBALE, T.L. et al. Comparison on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v.62, p.437-449, 2004.

MERMILLOD, P.; TRALDI, A.L.; BARIL, G.; BECKERS, J.F.; MASSIP,A.; COGNIE, Y. A vitrification method for direct transfer of sheep embryos. In: **Proceedings...** 15th annual Meeting of the AETE, Lyon. Fondation Marcel Merieux, Lyon, France. p. 212, 1999.

MERYMAN, H.T. Freezing injury and its prevention in living cells. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering.**, v.3, p.341-363, 1974.

MERYMAN, H.R.; WILLIAMS, R.J.; DOUGLAS, M.S.J. Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**, v.14, p.287-302, 1977.

MEZZALIRA, A.; MEZZALIRA, J. C.; MORAES, A. N. et al. Vitrification of bovine embryos: age of embryos and exposure time to cryoprotectant influences viability. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, p. 107-111,2004.

MIYAMOTO, H.; ISHIBASHI, T. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p. 427-432, 1978.

MIGISHIMA, F.; SUZUKI-MIGISHIMA, R.; SONG, S.; KURAMOCHI, T.; AZUMA,S.; NISHIJIMA, M.; YOKAYAMA, M. Successful Criopreservation of Mouse Ovaries by Vitrification. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 881-887,2003.

MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T.; MOGAS, T. Cryotops versus open pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology**, 2008.

MUKAIDA, T.; WADA, S.; TAKAHASHI, K.; PEDRO, P.B.; AN, T.Z.; KASAI, M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable condition for 8-cell mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 2874-2879, 1998.

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

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

NIASARI-NASLAJI, A.; HANSEN, P.J.; MOORE, K.; THATCHER, W.W. Successful cryopreservation of in vitro derived bovine blastocysts in microcapillary pipette tips. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 8, p. 1-7, 2007.

NICACIO,A.C. Avaliação do desenvolvimento após a criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2008, 109p.

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

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; SUZUKI, T. In vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved with ethylene glycol and sucrose. **Cryobiology**, v.32, p.455-460, 1995.

PALASZ, A.T., MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.14, p. 127-149, 1996.

PAPADOPOULOS, S.; RIZOS, D.; DUFFY, P.; WADE, M.; QUINN, K.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. **Anim. Reprod. Sci.**, v.74, p. 35-44, 2002.

PEREIRA, R. M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**, v.9, p. 267-277, 2008.

PICKETT, B.W.; BERNDTSON, W.E. Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: SALISBURY, G.W.; VAN DEMARK, N.L.; LODGE, J.R.; FREEMAN, W.H. (Eds.). *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. 2. ed. San Francisco: W.H. Freeman and Co., 1978. p.231-248.

PICKETT, B.W. *Principles of cryopreservation. Techniques for freezing mammalian embryos*: short course proceedings. Fort Collins: **Animal Reproduction Laboratory**, Colorado State University, 1986. p.4.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and ehydration at low temperature. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

RALL, W. F.; REID, D. S.; POLGE, C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. **Cryobiology**, v.21, p. 106-121, 1984.

RALL, W. F.; FAHY, G.M. Ice free cryopreservation of mouse embryos at – 196°C by vitrification. **Nature**, v.312, p. 573-575, 1985.

RALL, W. F. Cryopreservation of mouse embryos by vitrification. **Cryobiology**, v.23, n. 6, p. 548, 1986.

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

RAMMLER, D.H. The effect of DMSO on several enzymes systems. **Annals New York of Academy of Sciences**, v.141, p.291-299, 1967.

RAYOS, A.A.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M., et al. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with saccharose or trehalose. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, p.123-129, 1994.

RUSSELL, D. F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D.H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1255-1270, 2006.

SAHA, S.; RAJAMAHENDRAN, R.; BOEDIONO, A. et al. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8, or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step rehydration. **Theriogenology**, v.46, p.331-343, 1996.

SALLES, H.O.; ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A.A., et al. **Manual de Transferência de Embriões em Caprinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2002. 64p. (Embrapa Caprinos. Documentos, 40).

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

SEIDEL, G.E. Jr. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. Techniques for freezing mammalian embryos, 6, 1986, Colorado. **Proceedings...** Presented by Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, 1986.

SEIDEL, G.E. Jr.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O.; et al. Cryopreservation of equine embryos in 1,2 propanediol. **Equine Veterinary Journal**. Suppl. 8, p.87-88, aug. 1989.

SEIDEL, G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: **THECNQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS**, 1996, Fort Collins. Proceedings. Fort Collins: Colorado State University, 1996. p. 6-16.

SEIDEL JR., G.E. Modifyong oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.228-235, 2006.

SHAW, J. M.; JONES, G. M. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. **Human Reproduction Update**, v. 9, p. 583-605, 2003.

SIMPLÍCIO, A.A.; SALLES, H.O.; SANTOS, D.O. Transferência de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, Suplemento 5, p.17-27, 2002. Anais ... Congresso Norte/ Nordeste de Reprodução Animal, I, Recife, PE, 2002.

SIQUEIRA –PYLES, E.S.C. Vitriificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotetores. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006, 116p.

SON, W. Y.; YOON, S.H.; YOON, H.J.; LEE, S.M.; LIM, J.H. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. **Human Reproduction**, v.18, p.137-139, 2003.

SOMMERFELD, V.; NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. **Cryobiology**, v.38, p.95-105, 1999.

STEFANI, J. S.; PALHA, M. D. C.; CHRISTMANN, L.; ROSA, J. M.; SILVEIRA, M.C.; RODRIGUES, J. L. Laparoscopic versus surgical transfer of ovine embryos. **Theriogenology**, v. 33, p. 330, 1990.



STOREY, K.B.; STOREY, J.M. Frozen and alive. **Scientific American**, v.263, p.62-67, 1990.

SZELL, A.; SHELTON, J.N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.78, p.699-703, 1986.

TERVIT, H. R.; GOOLD, P. G.; MCKENZIE, R.D. Development of an effective goat embryo transfer regime. In: NEW ZEALAND SOCIETY ANIMAL PRODUCTION, 46, 1986, **Proceedings...**, p. 233-236, 1986.

TODOROV, I.; BERNARD, A.G.; McGRATH, J.J, et al. Studies on 2,3 butanediol as a cryoprotectant for mouse oocytes: use of saccharose to avoid damage during exposure or removal. **Cryo Letters**, v.14, p.37- 42, 1993.

TOMINAGA, K.; HAMADA, Y. Gel-loading tip as container for vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 47. p.267-273, 2001.

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

VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P, et al. 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., et al. Open pulled staw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.

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

VATJA, G. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.357-364, 2000.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservayion systems. **Theriogenology**, v.65, p. 236-244, 2006.

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

VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C.; STANDAET, V.; SCHOYSMAN, R. In vitro survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in an hemi-straw (HS) system. **Fertility and Sterility**, v.74, p. 215-216, 2000.

VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C.; STANDAET, V.; BOLLEN, N.; VAN ROOSENDAAL, E.; VANDERVORST, M.; SCHOYSMAN, R.; ZECH, N. Vitrification of human blastocysts with the hemi-straw carrier: Application of assisted hatching after thawing. **Human Reproduction**, v. 18, p. 1501-1511, 2003.

VIEIRA, A. D.; FORELL, F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J.L. Calves born after direct transfer of vitrified bovine in vitro-produced blastocysts derived from vitrified immature oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p. 314-318,2008.

VISINTIN, J. A.; MARTINS, J. F.; BEVILACQUA, E. M.; MELLO, M. R.; NICACIO, A. C.; ASSUMPCAO, M. E. Cryopreservation of bos taurus VS bos indicus embryos: Are they really different? **Theriogenology**, v. 57, p. 345-359, 2002.

WERLICH, D. E.; BARRETA, M.H.; MARTINS, L.T.; VIEIRA, A.D.; MORAES, A.N.; MEZZALIRA, A. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 77-82, 2006.

WHITTINGHAM, D.G. Principles of embryo preservation. In: Ashwood-Smith MJ, Farrant J, editors. Low temperature preservation in medicine and biology. Kent, Pitman Medical; 1980. cap 4, 65-83.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos by frozen to  $-196^{\circ}$  and  $-296^{\circ}$ . **Science**, v. 178, p. 411-414 , 1972.

WILMUT I. The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Science**, v. 11, p. 1071-1079, 1972.

WOWK, B.; LEITI, E.; RASCH, CM., et al. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. **Cryobiology**, v. 40, p. 228-236, 2000.

ZERON, Y. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, v.38, p.35-42, 1999.

# **CAPÍTULO 1**

# CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E ULTRA-ESTRUTURAIS DE EMBRIÕES CAPRINOS PRODUZIDOS *IN VIVO* SUBMETIDOS A DIFERENTES CRIOPROTETORES

P F B de Araújo-Lemos<sup>1</sup>, F F Freitas<sup>2</sup>, LM Freitas Neto<sup>3</sup>, J V de Melo<sup>4</sup>, C Peixoto<sup>4</sup>, M P Pinto<sup>5</sup>, MAL Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba- EMEPA/PB, Rua Eurípedes Tavares, 210 Tambiá, João Pessoa-PB, Brasil.*

<sup>2</sup>*Médica Veterinária Autônoma*

<sup>3</sup>*Laboratório de Biotécnicas Reprodutivas do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife-PE, Brazil. Corresponding author. E-mail: [maloufrpe@uol.com.br](mailto:maloufrpe@uol.com.br)*

<sup>4</sup>*Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Av. Prof. Luiz Freire, 01. Cidade Universitária - CEP: 50.740-540 - Recife - PE*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, Av. Prof. Luiz Freire, 1000–Cidade Universitária 50740-540 Recife – PE.*

## RESUMO

Objetivou-se identificar as características morfológicas e ultra-estruturais de embriões caprinos da raça Boer, produzidos *in vivo*, após a criopreservação utilizando-se diferentes crioprotetores (etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida). Os embriões foram obtidos de cabras superovuladas e distribuídos aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle - congelamento pelo método clássico - Etilenoglicol (n=75), Grupo DMSO (Dimetilsulfóxido) – vitrificação (n=74) e Grupo DF (Dimetilformamida) – vitrificação (n=74). O grupo controle permaneceu cinco minutos estabilizando na solução de Etilenoglicol (EG) sendo posteriormente envasados em palhetas de 0,25mL e submetido a congelamento automatizado. Os embriões do grupo DMSO foram equilibrados em solução de 10% de EG e 10% de DMSO e transferidos para solução de vitrificação com 20% EG e 20%DMSO. O grupo DF foi equilibrado em solução de 10% de EG e 10% de DF e depois transferido para solução de vitrificação com 20% EG e 20% DF + 0,5M sacarose. Todos os grupos foram avaliados por meio da análise da viabilidade embrionária pelo uso de sondas fluorescentes (Iodeto de Propídeo e Hoechst 33342). Os embriões analisados do grupo controle mantiveram grande parte das suas células integras após o descongelamento, onde 33,33% das amostras apresentaram-se

com danos, ou seja, apresentaram suas células coradas em vermelho. Os embriões do grupo DMSO analisados 26,66% estavam com suas células totalmente lesionadas, o restante das amostras 73,33% dos embriões analisados foram considerados viáveis. O grupo DF apresentou 60% das amostras danificadas. Estudo ultra-estrutural dos embriões por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que os embriões vitrificados revelaram uma maior preservação das células. Os embriões vitrificados com DMSO tiveram maiores taxas de sobrevivência *in vitro* (47,36%), os vitrificados com DF tiveram uma taxa de sobrevivência *in vitro* (31,58%), os congelados pelo método clássico obtiveram (25%) *in vitro*. Estes resultados indicam que, a solução de vitrificação contendo 20% de etilenoglicol + 20% de dimetilsulfóxido + 0,5 sacarose é um método eficiente para a vitrificação de embriões caprinos produzidos *in vivo*, demonstrou causar menos lesões ao citoesqueleto e as organelas celulares, evidenciando uma melhor viabilidade embrionária.

**Palavras-chave:** caprino, congelamento método lento, sondas fluorescentes, viabilidade embrionária, vitrificação.

## **ABSTRACT**

The purpose of the study was to identify the morphological and ultrastructural characteristics of Boer goat embryos produced *in vivo*, after cryopreservation using different cryoprotectants (ethylene glycol, dimethylsulfoxide and dimethylformamide). Embryos were obtained from superovulated goats and randomized into three groups: control group - Classic freezing - Ethylene glycol (n = 75), DMSO (dimethyl sulfoxide) - vitrification (n = 74) and DF (Dimethylformamide) - vitrification (n = 74). The control group was given five minutes for stabilizing the solution of Ethylene glycol (EG) and embryos were then packed in straws of 0.25 mL and subjected to automated freezing. The embryos of group DMSO were mixed in a solution of 10% EG and 10% DMSO and transferred to a vitrification solution with 20% EG and 20% DMSO. The group DF consisted of a balanced solution containing 10% EG and 10% of DF and then transferred to a vitrification solution with 20% EG and 20% DF + 0.5 M sucrose. All groups were evaluated by analysis of embryonic viability by use of fluorescent probes (iodide propidium and Hoechst 33342). The embryos from the control group kept most of its viable cells after thawing, 33.33% of the samples presented damage or their cells stained in red. The embryos of group DMSO had an incidence of lesions of 26.66% but

the remaining samples (73.33%) of the embryos analyzed were considered viable. The group DF showed 60% of the samples damaged. Ultrastructural study of embryos by transmission electron microscopy showed that the vitrified embryos had a greater preservation of cells. Embryos vitrified with DMSO had higher rates of in vitro survival (47.36%) followed by the embryos glazed with DF (31.58%), and those in the classic freezing group obtained the lowest in vitro survival rate (25%). These results indicate that the solution glazing containing 20% ethylene glycol + 20% dimethylsulfoxide + 0.5 sucrose is an effective method for the cryopreservation of goat embryos produced *in vivo*, and cause less damage to the cytoskeleton and cellular organelles, thus indicating improved embryonic viability.

**Keywords:** goat, slow freezing method, fluorescent probes, embryo viability, embryo vitrification.

## INTRODUÇÃO

A criopreservação de embriões tornou-se um método amplamente utilizado na transferência de embriões, pois a taxa de sobrevivência embrionária congelados/descongelados é quase comparável com embriões frescos. No entanto, a criopreservação pelo método clássico lento expõe o embrião a diferentes fases de congelamento, ocorrendo à ação deletéria de fatores físicos, químicos e biológicos.

Diferentes crioprotetores como glicerol, DMSO e etilenoglicol são utilizados na congelção de embriões caprinos, porém os melhores resultados são obtidos com o uso de etilenoglicol (TRALDI, 2000).

Em caprinos, o primeiro sucesso da criopreservação de embriões foi com o método de congelamento lento em 1976 (BILTON e MOORE, 1976). Posteriormente, os embriões foram criopreservados por congelamento lento até 1990, com uma taxa de sobrevivência variando entre 27% e 59%. Em 1990, a primeira transferência bem sucedida de embriões caprinos vitrificados foi relatado por Yuswiati e Holtz (1990). Eles vitrificaram com etilenoglicol (EG) e propanodiol, em palhetas de 0,25 mL. Em 2001, a primeira sucesso da transferência de embriões de cabra utilizando a técnica de palhetas abertas (OPS) foi realizada por El-Gayar e Holtz (2001). No entanto, apenas os resultados disponíveis são limitados após transferência de embriões caprinos vitrificados, em geral com menores taxas de sobrevivência do que os obtidos após congelamento clássico lento (TRALDI, 2000; BRANCA et al., 2000).

A perda da viabilidade embrionária associada com o congelamento pode ser atribuída ao tipo e concentração do crioprotetor, ao protocolo de congelamento, a

temperatura em que os embriões são transferidos para o nitrogênio líquido, e ao estágio de desenvolvimento do embrião (COCERO et al., 2002). Devido à fragilidade da membrana plasmática e sua sensibilidade à congelação é necessária a investigação de métodos para superar ou prevenir a ruptura do citoesqueleto embrionário durante e após a criopreservação.

O objetivo foi identificar as características morfológicas e ultra-estruturais de embriões caprinos da raça Boer, produzidos *in vivo*, após a criopreservação utilizando-se diferentes crioprotetores (etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local do Experimento**

O experimento foi realizado na Estação Experimental de Pendência localizada no Município de Soledade-PB e na Estação Experimental Benjamin Maranhão, localizada em Campo de Santana-PB, ambas pertencentes à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA/PB) e no Laboratório de Biotécnicas da Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e no Departamento de Energia Nuclear (UFPE).

### **Seleção das Doadoras**

Foram utilizadas 30 fêmeas da espécie caprina da raça Boer, apresentando faixa etária média 4,1 anos de idade, sem distúrbios reprodutivos, com ciclo estral regular e em adequado estado nutricional (escore corporal mínimo de 3) e sanitário. A avaliação das doadoras incluiu exames clínico geral, ginecológico, parasitológico e CAEV, para evitar a inclusão de animais com condições comprometidas.

Os animais eram mantidos em apriscos cobertos, onde recebiam volumoso a base de feno de tifton *ad libitum*, além de uma suplementação com concentrado com 18% de proteína bruta, contendo milho, soja, trigo e calcário, na proporção de 500 g/cabeça /dia. Os animais tinham livre acesso à água e sal mineral.

### **Superovulação e Produção dos Embriões**

Os animais foram submetidos à estimulação de múltiplas ovulações mediante aplicação no dia 0 do tratamento, de dispositivos vaginais impregnados com 0,33g de progesterona natural, CIDR ((Eazi-Breed CIDR, Pfizer, Nova Zelândia). A superovulação teve início no 9º dia, utilizando 300 UI de FSH (Pluset, Hertape Calier, São Paulo, Brasil) divididos em seis doses decrescentes administradas em intervalos de 12 horas. No 11º dia do tratamento, foi também aplicado 0,150 mg de d-Cloprostenol (Prolise, Tecnopec, São Paulo, Brasil) em duas doses, momento em que também foram removidos os implantes.

Foram realizadas montas naturais controladas a partir do 12º dia de tratamento até a fêmea não aceitar mais a monta. Foi colocado um novo implante 36 horas após a última cobertura, o mesmo era removido 20 horas antes da colheita, e aplicado 0,75 mg de d-Cloprostenol(Prolise, Tecnopec, São Paulo, Brasil).

### **Colheita dos Embriões**

As colheitas foram realizadas no 6<sup>o1/2</sup> e 7º dia após o início do estro, visando obter embriões em estágio de mórula até blastocisto expandido, por via transcervical.

Os animais foram posicionados em estação, contidos numa plataforma que possibilitasse a operação. Inicialmente a região perineal foi devidamente limpa e higienizada para introdução do espéculo vaginal a fim de visualizar a cérvix. Após seu pinçamento a cervix foi tracionada até o ponto mais próximo do vestíbulo vaginal com o auxílio de duas pinças de Pozzi, para permitir a introdução do cateter de lavagem uterina para a colheita dos embriões. Foram utilizados 240 mL por animal do meio de lavagem DPBS acrescido com 10% de soro fetal bovino a 37°C. O processo de lavagem uterina para recuperação embrionária foi executado através de um equipo de duas vias em sistema de circuito fechado e a solução de lavagem colhida foi coletada em um Becker, aferido o volume e distribuídos em placas de Petri plásticas de 100 mm de diâmetro e imediatamente levado ao esteriomicroscópio para a identificação e classificação dos embriões em aumento de 10 e 20X.

As fêmeas receberam 1mL/ 10kg de peso de oxitetraciclina LA (Oxitetra LA, Agener União, Brasil) via intramuscular e 0,375 mg de cloprostenol (Prolise,Tecnopec,São Paulo, Brasil) pela mesma via.

### **Avaliação e classificação da morfologia embrionária**



O líquido colhido permaneceu em placas de Petri grande (100x15 mm de diâmetro) com fundo quadriculado para procura dos embriões por meio de esteriomicroscópio a um aumento de 10 a 20x. As estruturas encontradas foram transferidas com auxílio de uma pipeta para placas de Petri de 35 mm, contendo meio de manutenção - TQC Holding Plus (Nutricell, Bioniche/USA). Os embriões foram avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade seguindo os critérios morfológicos da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Stringfellow e Seidel, 1998), como embriões de grau I (excelente), II (bom), III (pobre) e IV (morto ou degenerado). Foram selecionados apenas embriões classificados como grau I e II.

### **Criopreservação dos Embriões**

#### **Congelação Clássica – Grupo Controle**

Os embriões foram congelados utilizando congelador automático de embriões (TK 3000, Uberaba, Brasil). Antes da congelação os embriões permaneceram por cinco minutos estabilizando na solução de Etilenoglicol- TqC Ethylene Glycol Freezer Plus (Nutricell, Bioniche/USA) e envasados em palhetas de 0,25 mL adequadamente identificadas. A coluna contendo o embrião com a solução crioprotetora foi separada por duas colunas com solução de manutenção, e também por duas bolhas de ar de 1,0 cm. As palhetas foram seladas e colocadas no congelador inicialmente programado a uma velocidade de resfriamento de  $-1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $-6^{\circ}\text{C}$ , a partir da temperatura ambiente. Alcançada a temperatura de  $-6^{\circ}\text{C}$ , o processo de resfriamento foi interrompido por cinco minutos, para a indução da cristalização (“*seeding*”) esperando-se 10 minutos para reiniciar a curva, de modo que, o congelador de embriões foi reprogramado para uma velocidade de congelação de  $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  até  $-32^{\circ}\text{C}$ . Após 5 minutos de estabilização à temperatura final de congelação, as palhetas contendo os embriões foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  e acondicionadas em rack, e armazenadas nos botijões criobiológicos.

#### **Vitrificação em OPS (Open Pulled Straw) – Grupo DMSO e Grupo DF**

Todas as soluções para a vitrificação foram preparadas usando a solução base com H-TCM 199 suplementado com 20% de SFB (Solução de manutenção). Os embriões foram expostos primeiramente à solução manutenção por 5 minutos e em seguida nas soluções de vitrificação. Imediatamente após a passagem pela solução de manutenção, os embriões do grupo DMSO foram transferidos a solução de 10% de

Etilenoglicol (EG) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) por 1 minuto e em seguida transferidos para de solução de 20% de EG + 20% de DMSO + 0,5M sacarose por 40 segundos no máximo. E para os embriões do grupo DF, os embriões foram transferidos a solução de 10% de Etilenoglicol (EG) e 10% de Dimelformamida (DF) por 1 minuto e em seguida foram transferidos para de solução de 20% de EG + 20% de DF + 0,5M sacarose por 40 segundos no máximo. Em seguida, os embriões foram aspirados em 2 $\mu$ L da última solução de vitrificação, contendo 1 a 2 embriões e envasados por capilaridade em OPS devidamente identificadas com número da fêmea e classificação do embrião. Imediatamente as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido a -196°C e acondicionadas em racks individuais para cada fêmea e armazenadas em botijões criobiológicos.

### **Descongelamento dos embriões congelados**

Os embriões foram descongelados expondo-se as palhetas à temperatura ambiente por 10 segundos e imersão em banho-maria a 37°C por 20 segundos. O conteúdo das palhetas foi esvaziado em placa de quatro poços, contendo meio de manutenção - TQC Holding Plus, onde permaneceram por 5 minutos, e em seguida era novamente avaliado quanto a sua morfologia e qualidade.

### **Aquecimento dos embriões vitrificados**

Imediatamente após a retirada do nitrogênio líquido, as palhetas foram aquecidas por 3 segundos no ar, e posteriormente a extremidade mais fina submergida em solução de aquecimento. A remoção do crioprotetor dos embriões foi feita em três etapas, numa placa de quatro poços, contendo o meio de manutenção usando a solução base com H-TCM 199 suplementado com 20% de SFB + 0,33 M de Sacarose (Poço 1 e 2) por 1 minuto cada, em seguida no meio de manutenção usando a solução base com H-TCM 199 suplementado com 20% de SFB + 0,2 M de Sacarose, por 1 minuto (Poço 3) e por fim durante 5 minutos, no meio de manutenção usando a solução base com H-TCM 199 suplementado com 20% de SFB

### **Avaliação da viabilidade embrionária**

Os embriões foram incubados por cinco minutos em DPBS acrescido de BSA 1% e 125mg/ml de Iodeto de Propídeo, sendo posteriormente transferidos para gotas

colocadas sobre lâmina histológica contendo uma solução de DPBS com 100mg/ml de Hoechst 33342. A preparação foi coberta com lamínula.

Os embriões corados foram examinados em microscópio invertido (Leica DM 4000), filtro azul 535 e 617 nm, equipado com luz fluorescente para a determinação de células vivas e mortas. Os blastômeros que fluoresceram em azul foram considerados viáveis (com membrana plasmática íntegra) enquanto aqueles que fluoresceram em vermelho ou rosa foram considerados inviáveis. Entretanto, embriões com menos de 50% de células vermelhas foram considerados viáveis.

### **Ultra-estrutura dos embriões por microscopia eletrônica de transmissão**

Para a análise ultra-estrutural foram selecionados aleatoriamente 30 embriões, sem prévia avaliação de sua morfologia, sendo o grupo Controle (n=10), grupo DMSO (n=10) e grupo DF (n=10). Os embriões foram fixados em Solução Karnovsky (2 horas, 4 °C), após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão Cacodilato de sódio a 0,1M (pH 7,4) e, posteriormente, foram pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio utilizando o mesmo tampão. Após a desidratação, em séries crescentes de etanol, os embriões foram embebidos em resina Epon. Os cortes ultra-finos foram obtidos com navalha de diamante, montados em grade de cobre e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os embriões foram examinados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (FEI Morgani 268 D, Eindhoven, Netherlands), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife/PE – CETENE.

### **Avaliação das taxas de re-expansão após o aquecimento dos embriões**

Para realização da cultura *in vitro*, os embriões foram aquecidos e avaliados morfológicamente. Os embriões foram cultivados em meio SOF (Nutricell). Utilizamos 400 µl do meio SOF + 400 µl de óleo mineral (Sigma), sob atmosfera composta por 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C, contidos em placas de petri de quatro poços, o meio ficou estabilizando (overnight), para posterior cultivo dos embriões, a fim de permitir o desenvolvimento embrionário. A capacidade de sobrevivência dos embriões foi avaliada com 6, 12 e 24 horas após a cultura. O critério de viabilidade adotado para todos os grupos consistiu na observação da expansão da blastocèle.

## **Análise Estatística**

Para a análise estatística das taxas de re-expansão, foi utilizado o Teste de Qui-quadrado para comparações múltiplas, considerando-se o nível de significância de 5%. Para as análises de viabilidade embrionária e microscopia eletrônica de transmissão foi realizada uma análise descritiva.

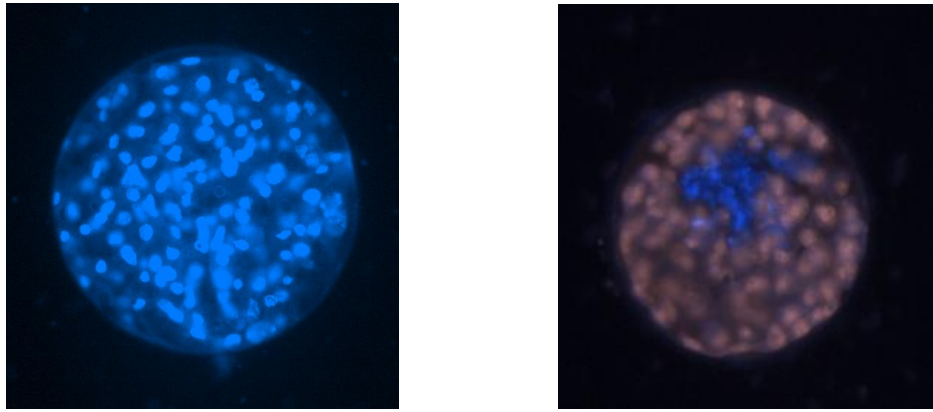
## **RESULTADOS**

Foram colhidos 246 embriões de 30 doadoras, dos quais 223 foram selecionados de excelente (grau I) e boa (grau II) qualidade, correspondendo a um percentual de 91% dos embriões colhidos, estava estágio de blastocisto e blastocisto expandido. Após a criopreservação pelo método clássico o percentual de embriões grau I e II foi de 51,07%, os embriões vitrificados com DMSO e DF foi 78,39 % e 65,21% respectivamente.

A viabilidade embrionária foi avaliada pelo uso de sondas fluorescentes, utilizamos como corante o iodeto de propídeo e o Hoechst 33342. Os embriões analisados do grupo controle, que foram criopreservados pelo método clássico lento, mantiveram grande parte das suas células integras após o descongelamento, 33,33% (5/15) das amostras apresentaram-se lesionadas, ou seja, apresentaram suas células coradas em vermelho.

Os embriões do grupo DMSO analisados 26,66% (4/15) estavam com suas células totalmente lesionadas, o restante das amostras 33,33% (5/15) apresentaram menos da metade das suas células lesadas e 40% (6/15) dos embriões analisados apresentaram pouca ou nenhuma célula lesionada, sendo assim, 73,33% dos embriões analisados foram considerados viáveis.

O grupo DF apresentou 60% (9/15) das amostras lesadas, ou seja, os embriões estavam com suas células totalmente lesionadas, o restante das amostras, ou seja, 40% (6/15) foram considerados viáveis, as células estavam pouco lesionadas ou totalmente íntegras.



**Figura 1** – Blastocistos expandidos coletados de cabras Boer, corados com Iodeto de Propídeo e Hoechst 33342 e examinados sob microscópio de fluorescência. O embrião da esquerda apresenta 100% de suas células íntegras (azuis) e o embrião da direita, apresentando grande número de células lesadas (vermelhas).

Com base nas características morfológicas ultra-estruturais dos embriões do grupo controle, observamos que as células estavam espalhadas, ou seja, sem uniformidade. A membrana plasmática e nuclear rompidas e as cromatinas difundidas. Núcleos aumentados de tamanho e irregulares. Em algumas amostras, a zona pelúcida estava lesada, as células perderam as junções comunicantes, grande quantidade de vacúolos e diminuição das microvilosidades, as mitocôndrias com as criptas desorganizadas, intumescidas e algumas estavam rompidas. As células estavam em sofrimento, com severas lesões, indicando degeneração.

Os embriões do grupo DF apresentaram as suas células com lesões intermediárias, as células estavam um pouco dispersas, núcleo denso, sem conexão, e com perda das junções intracelulares e presença de vacúolos. As organelas estavam preservadas com as mitocôndrias com as criptas evidentes, e formatos variados. Observamos também a presença de ribossomos.

O grupo DMSO apresentou as células com uma maior uniformidade, com poucas lesões, as células estavam com maioria das organelas íntegras, as zonas pelúcidas manteve-se preservada, integridade de membrana plasmática com longas microvilosidades, as quais se projetavam para o interior da zona pelúcida. As mitocôndrias apresentavam com formas variadas sendo principalmente arredondadas ou alongadas, com criptas evidentes, que estavam distribuídas por todo citoplasma,

observou-se o complexo de Golgi, ribossomos, as junções celulares eram visíveis, evidenciando uma organização celular.

Os resultados das características analisadas demonstraram que os embriões do grupo DMSO apresentaram menos danos ao citoesqueleto com uma maior organização celular e preservação das organelas.

Os resultados da taxa de re-expansão dos embriões criopreservados pelo método clássico e vitrificado são mostrados na tabela 2. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) na taxa de re-expansão entre os grupos controle e DF. No entanto, os embriões do grupo DMSO tiveram uma maior porcentagem na taxa de sobrevivência.

**Tabela 2** – Taxas de re-expansão de embriões caprinos criopreservados pelo método clássico e por vitrificação (DMSO e DF)

Grupos	Embriões			
	(n)	6 h	12 h	24h
Controle	20	0 (0)	2 (10%)	5 (25%) <sup>a</sup>
DMSO	19	3 (15,79%)	6(31,58%)	9 (47,36%) <sup>b</sup>
DF	19	1 (5,26%)	4(21,05%)	6 (31,58%) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Grupos seguidos de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ )

## DISCUSSÃO

A qualidade do desenvolvimento do embrião determina a qualidade do blastocisto, bem com os resultados finais. Em nosso estudo, obtivemos após a criopreservação de 51,07% de embriões grau I e II, sendo observados resultados similares em estudos anteriores com cabras Alpinas e Saanen, relatado por Baril et al (2000).

O Iodeto de propídeo é um composto fluorescente que se liga ao DNA e normalmente não atravessa a membrana celular, por ser pouco lipossolúvel, portanto quando atravessa indica perda de viabilidade. O Hoechst é comumente usado para visualizar os núcleos e as mitocôndrias, sendo capazes de atravessar as membranas celulares intactas. Pelo exame de avaliação da viabilidade embrionária por meio de sondas fluorescentes foi evidenciado que os embriões submetidos ao processo de criopreservação pelo método clássico lento (grupo controle) foram considerados viáveis,

pois apresentavam-se com 66,67% das amostras com as células integras. Sabe-se que a perda da viabilidade embrionária associada com a criopreservação pode ser influenciada pelo tipo e a concentração do crioprotetor utilizado, protocolo de congelação, o estágio de desenvolvimento dos embriões, a espécie e o genótipo do animal (BETTENCOURT et al., 2009). A criopreservação de embriões envolve a exposição inicial aos crioprotetores, a congelação a temperaturas inferiores a zero, o armazenamento, a descongelação e a posterior diluição e remoção do crioprotetores com conseqüente retorno a um ambiente fisiológico que permitirá o desenvolvimento. A estrutura celular deve ser mantida íntegra durante todo o procedimento da criopreservação. O princípio mais importante da criopreservação é reduzir os danos causados pela formação de gelo intracelular (SHAW et al., 1999). Desta forma a curva de congelação deve ser ótima para permitir uma remoção de água eficiente, prevenindo a crioinjúria por formação de cristais de gelo, e ao mesmo tempo minimizar o efeito tóxico da exposição às altas concentrações de solutos (CAMPOS-CHILLON et al., 2006). No presente estudo, a qualidade dos embriões (grau I e II), a curva de congelamento (ECAP1), o crioprotetor/concentração (etilenoglicol 1,5 M) exerceram efeito positivo sobre a viabilidade dos embriões criopreservados.

Sob a mesma avaliação, os embriões vitrificados utilizando dimetilsulfóxido (grupo DMSO) como crioprotetor, observou-se que a maioria das amostras (73,34%) encontravam-se com as células íntegras. Este crioprotetor preserva a integridade das membranas lipídicas durante o processo de resfriamento e aquecimento. Essa característica faz com que seja o crioprotetor de eleição na vitrificação de células e tecidos, quando comparado a outros crioprotetores de baixo peso molecular (DE LA TORRE e STANLEY, 2007).

Por conseguinte, o grupo vitrificado com o DF, apresentou 46,67% das células embrionárias íntegras. Nossos resultados diferem do encontrado por Fuku et al. (1995), Mukaida et al. (1998), Migshima et al. (2003), Siqueira-Pyles (2006), Baudot et al. (2007) que evidenciaram efeito benéfico na criopreservação de embriões ovinos, bovinos, humanos e camundongos. O crioprotetor DF apresentou um efeito benéfico na criopreservação de embriões, devendo ser melhor explorado.

As características ultra-estruturais observadas em microscopia eletrônica de transmissão revelaram que os embriões vitrificados com a associação etilenoglicol + DMSO apresentaram-se com poucas alterações, com o citoesqueleto mantendo-se preservado, porém foi evidenciada a existência de muitos vacúolos, os quais foram

observados, em altas proporções, em todos os grupos experimentais. Foi considerado que os embriões vitrificados com a associação etilenoglicol + DF apresentaram lesões intermediárias às organelas celulares, com a maioria delas apresentando-se íntegras. Porém, com algumas mitocôndrias intumescidas, com a membrana rompida, sem, no entanto serem evidenciadas em todos os embriões analisados. Os embriões submetidos ao protocolo de criopreservação convencional apresentaram lesões severas às estruturas celulares, com a maioria dos embriões apresentando total desorganização celular. Estas alterações demonstraram que os embriões caprinos foram mais sensíveis ao protocolo de criopreservação lento, diferentemente como observado para embriões ovinos, que demonstraram melhor integridade ultra-estrutural à criopreservação lenta (dados não publicados).

De acordo com Whittingham (1976), não foi observada nenhuma alteração ultra-estrutural nos embriões congelados comparados com os frescos, mas existe uma diferença funcional, provavelmente devido a um retardo na retomada das atividades metabólicas, influenciando o desenvolvimento embrionário após o descongelamento.

Na opinião de Elsdén (1988), embriões bovino descongelados, apresentando lesões nas zonas pelúcidas, geralmente decorrentes de planos de fraturas formados na matriz extracelular de gelo, frequentemente apresentam a blastocela colapsada, podendo também estar comprometidos em sua massa celular. No entanto, para Niemann (1990), lesões restritas unicamente à zona pelúcida não afetam o desenvolvimento embrionário.

A literatura é escassa quanto a avaliação ultra-estrutural de embriões caprinos. As lesões evidenciadas neste estudo foram similares às encontradas em outras espécies bovino: Pinto Neto et al., 2001; ovinos: Cocero et al., 2002 e Bettencourt et al., 2009; eqüino: Curcio, 2006.

No estudo, todos os embriões foram criopreservados em estágio de blastocisto e blastocisto expandido, neste caso a idade do embrião não interferiu nos protocolos de congelamento. Conforme observado por Bettencourt et al., 2009, que também não observaram diferença nas alterações ultra-estruturais de embriões ovinos criopreservados com etilenoglicol 1,5M pelo método clássico lento e vitrificados com a associação EG + DMSO e EG + DF. Cocero et al., (2002) analisando as características ultra-estruturais de embriões ovinos criopreservados pelo método clássico comparando o efeito do glicerol e etilenoglicol, concluíram que os embriões criopreservados com etilenoglicol apresentaram uma maior uniformidade na conservação dos blastômeros do que os embriões criopreservados com glicerol, independente do estágio de



desenvolvimento dos embriões. No entanto, observaram que os embriões em estágio de mórula apresentaram os blastômeros totalmente danificados quando criopreservados com glicerol, o que não aconteceu com os embriões em estágio de blastocisto, sugerindo que o etilenoglicol protegeu as membranas e estruturas citoplasmáticas das células embrionárias contra as injúrias da criopreservação.

O DMSO preserva a integridade de proteínas isoladas e das membranas lipídicas durante o processo de resfriamento e aquecimento. Essa característica faz com que seja o crioprotetor de eleição na vitrificação de células e tecidos, quando comparados a outros crioprotetores de baixo peso molecular (DE LA TORRE e STANLEY, 2007).

A solução composta por EG e DMSO tem sido amplamente utilizada, proporcionando resultados bastante satisfatórios (MEZZALIRA et al., 2006). Todavia, o emprego de DMSO apresenta como inconveniente à necessidade de preparo da solução no momento do uso, em função de sua característica higroscópica, o que dificulta sua aplicação nas rotinas de criopreservação (WERLICH et al., 2006).

De acordo com Mazur (1966), na temperatura de  $-130^{\circ}\text{C}$  não ocorrem reações físico-químicas celulares, permanecendo as células em um estado de anabiose. O autor ressalta que o problema fundamental da exposição das células a baixas temperaturas não é o armazenamento a  $-196^{\circ}\text{C}$ , mas sim a ocorrência de dois fatores letais durante o resfriamento ou aquecimento: cristalização e o efeito da solução. As lesões produzidas pela cristalização, quando as células são resfriadas a velocidades inadequadas em proporcionar uma eficiente desidratação, ocorrem pela formação dos cristais de gelo intracelulares, que levam à lise das organelas. Por outro lado, a desidratação celular excessiva conduz ao aumento da concentração dos componentes sólidos celulares, levando a uma precipitação, que também culmina com a desorganização estrutural das organelas, fenômeno denominado de efeito da solução.

As soluções crioprotetoras utilizadas na vitrificação contêm misturas de agentes permeáveis, macromoléculas e carboidratos visando à prevenção de lesões nas membranas celulares durante o resfriamento e o aquecimento. Segundo, Hotamisligil et al. (1996), relataram que os açúcares são capazes de preservar a estrutura e a integridade funcional da membrana. Os aditivos com alto peso molecular como os dissacarídeos (sacarose e trealose) não penetram a membrana celular, mas podem reduzir significativamente a quantidade de crioprotetor intracelular, levando à minimização do efeito tóxico (LIEBERMANN et al., 2002)

Os embriões do grupo DMSO tiveram uma maior porcentagem na taxa de sobrevivência *in vitro* (47,36%), não houve diferença ( $P>0,05$ ) na taxa de re-expansão entre os grupos controle (25%) e DF (31,58%). Nicacio (2008), estudando embriões bovinos obteve índices de re-expansão de 34,66%, pelo método controlado, cultivado com meio SOF por um período de 24 horas, e pela vitrificação obteve índice de 19,62%.

Bertolini et al. (2005) avaliaram a sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de mórulas e blastocistos de camundongo após a vitrificação em 6,12M de glicerol com prévia desidratação. Os resultados mostraram que as taxas de sobrevivência *in vitro* independentemente do estágio de desenvolvimento embrionário, não foram afetadas pelas concentrações e tempos de equilíbrio.

Em embriões ovinos (WARE e BOLAND, 1987), um breve período de cultivo parece ser necessário para uma melhor avaliação da morfologia embrionária. Segundo estes autores, isto se deve principalmente ao fato de que os embriões expostos às soluções crioprotetoras muito concentradas durante o congelamento e/ou diluição, podem ainda estar muito desidratadas quando a avaliação é feita muito precocemente após o descongelamento e a diluição.

Segundo Palha (1992), a afirmativa de que a análise isolada dos resultados da avaliação morfológica dos embriões descongelados, obtida imediatamente após a diluição dos crioprotetores é inadequada como parâmetro para se verificar a eficiência dos diversos tratamentos de criopreservação. A autora observou que dentro de cada categoria morfológica, a distribuição dos distintos grupos experimentais considerando-se, por exemplo, os percentuais de embriões bons dispostos em ordem decrescente não se mantêm a mesma após a segunda avaliação.

De acordo com Maurer (1976), o desenvolvimento embrionário *in vitro* é o critério mais comum de avaliação dos embriões congelados. Este autor afirmou que para embriões frescos, na maioria das espécies, a permanência por até 48 horas em cultivo *in vitro*, não compromete a sua viabilidade *in vivo* após a transferência para receptoras.

Para Leibo (1984), existem claras evidências que determinadas injúrias do congelamento que não são imediatamente aparentes na avaliação após o descongelamento, e que levam algum tempo para serem detectadas. Deste modo, um breve período de cultivo *in vitro* pode ser suficiente, para tornar tais injúrias aparentes.

Existem inúmeros protocolos que têm sido utilizados para a criopreservação de embriões. Variações no tipo de crioprotetor, concentrações destas soluções e também nas taxas de congelamento e aquecimento podem ser ajustados. Um protocolo universal é

impraticável, devido à diferença entre espécies. Segundo Mazur (1970), cada tipo de célula tem sua própria taxa de resfriamento ideal, e permeabilidade ao crioprotetor também muda com as mudanças na temperatura.

De acordo com Vajta e Nagy (2006), esta técnica pode tornar-se uma alternativa comercialmente viável para a criopreservação de embriões. Além da facilidade e praticidade da vitrificação, que permitiu o desenvolvimento de diferentes métodos de envases, que utilizam o macro ou microvolume na tentativa de aumentar a eficiência da vitrificação de embriões.

## **CONCLUSÕES**

Podemos concluir que a vitrificação com a associação de 20% Etilenoglicol + 20% Dimetilsulfóxido + 0,5M sacarose, foi o protocolo que demonstrou causar menos lesões ao citoesqueleto e as organelas celulares de embriões caprinos produzidos *in vivo*, evidenciando uma melhor organização e integridade celular e com isso melhor viabilidade embrionária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARIL,G.; LEBOEUF, B.; POUGNARD, J.L.; BERNELAS, D.; BONNE, J.L.; FORGERIT, Y. et al. Embryo transfer after freezing with ethyleneglycol from alpine and saanen dairy goats. In: Proceeding of the 7<sup>th</sup> international conference on goats; 2000.p. 1030 (abstract).
- BAUNOT, A.; COURBIERE, B.; ODAGESCU, V.; SALLE, B.; MAZOYER, C.; MASSARDIER, J.; LOMAGE, J. Towards whole sheep ovary cryopreservation. **Cryobiology**, v.55. p. 236-248, 2007.
- BETTENCOURT, E.M.V.; BETTENCOURT, C.M.; SILVA, J.N.C.E.; FERREIRA, P.; MATOS, C.P.; OLIVEIRA, E.; ROMÃO, R.J.; ROCHA, A.; SOUSA, M. Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved *in vivo* produced ovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, p. 947-958, 2009.
- BERTOLINI, M.; LANGE, M.C.; RODRIGUES, J.L. In vitro and in vivo survival of mouse morulae and blastocysts following vitrification in 45% glycerol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 245-251, 2005.
- BILTON, R.J.; MOORE, N.W. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. **Australian Journal Biological Sciences**, v. 29, p. 125, 1976.
- BRANCA, A.; GALLUS, M.; DATTENA, M.; CAPPAL, P. Preliminary study of vitrification of goat embryos at different stages of development. In: Proceedings of the 7th international conference on goats; p. 1032 (abstract).2000.
- CAMPOS –CHILLON, L.F.; WALKER, D.J. de TORRE- SANCHEZ, J.F.; SEIDEL, G.E. Jr. In vitro assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, p. 1200-1214, 2006.
- COCERO, M.J.; MORENO DÍAZ DE LA ESPINA, S.; AGUILAR, B. Ultrastructural Characteristics of Fresh and Frozen-Thawed Ovine Embryos Using Two Cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1244-1258, 2002.
- CURCIO, B.da R. Vitriificação de oócitos imaturos de equinos: Características morfológicas ultra-estruturais e maturação nuclear in vitro. **Tese** (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006. 62f.
- DE LA TORRE, J. C.; STANLEY, W.J. Pharmacology of dimethyl sulfoxide: an update. **Cryobiology**, v.55, p. 351, 2007.
- EL-GAYAR, M.; HOLTZ, W. Technical note: vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 2436-2438, 2001.
- ELSDEN, R.P. Classification of embryos after freezing and thawing. In: COLORADO STATE UNIVERSITY. Animal mammalian embryos. (Short course proceedings). Fort Collins, p. 34-45, 1988.

FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.32, p.139-156, 1995.

GREE, R.E. Viabilidade de embriões ovinos vitrificados ou congelados submetidos às técnicas direta e indireta de inovulação. **Dissertação** (mestrado em Ciência Veterinária)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007, 63p.

HOTAMISLIGIL, S.; TONER, M.; POWERS, R.D. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 161-168, 1996.

LEIBO, S.P. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, v. 21, p. 767-790, 1984.

LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M.J. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1671-1680, 2002.

MAURER, R. Freezing mammalian embryos: a review of techniques. **Theriogenology**, v. 9, p. 45-68, 1976.

MAZUR, P. Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells. **Cryobiology**, v. 2, p. 181-192, 1966.

MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. **Science**, v. 168, p. 939-949, 1970

MEZZALIRA, A.E.; VIEIRA, A.D. Criopreservação de oócitos e embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 191-194, 2006.

MIGISHIMA, F.; SUZUKI-MIGISHIMA, R.; SONG, S.; KURAMOCHI, T.; AZUMA, S.; NISHIJIMA, M.; YOKAYAMA, M. Successful Criopreservation of Mouse Ovaries by Vitrification. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 881-887, 2003.

MUKAIDA, T.; WADA, S.; TAKAHASHI, K.; PEDRO, P.B.; AN, T.Z.; KASAI, M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable condition for 8-cell mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 2874-2879, 1998.

NICACIO, A.C. Avaliação do desenvolvimento após a criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Tese** (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2008, 109f.

NIEMANN, H. Cryopreservation of bovine embryos in the Field. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 8, p. 5-7, 1990.

PALHA, M. das D.C. Congelamento em etapas e vitrificação de mórulas e blastocistos de *Mus musculus*. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Medicina Veterinária, Recife, 1992, 355p.

PINTO NETO, A.; ESPER, C.R.; SILVA FILHO, J.M.; FONSECA, J.F.; MOTA, M.F.; BELISÁRIO, H.; PARDINI, W.S.; ALVIM, M.T.T. Análise ultra-estrutural de embriões bovinos da raça nelore. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 4, p. 189-194, 2001.

SHAW, J.M.; ORANRATNACHIA, A.; TROUNSON, A.O. **Criopreservation of oocytes and embryos**. In TROUNSON, A. O.; GARDNER, D.K., editors. Handbook of In Vitro Fertilization, CRS Press, 373-412, 1999.

SIQUEIRA –PYLES, E.S.C. Vitrificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotetores. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006, 116p.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Eds). **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**: um guia de procedimento e informações gerais para uso em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários. Illinois: Savoy, 1998. 180p.

TRALDI, A.S. Vitrification of goat in vivo and in vitro produced embryos. In: Proceedings of the 7th international conference on goats; (abstract), p. 1031, 2000.

VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P, et al. 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.

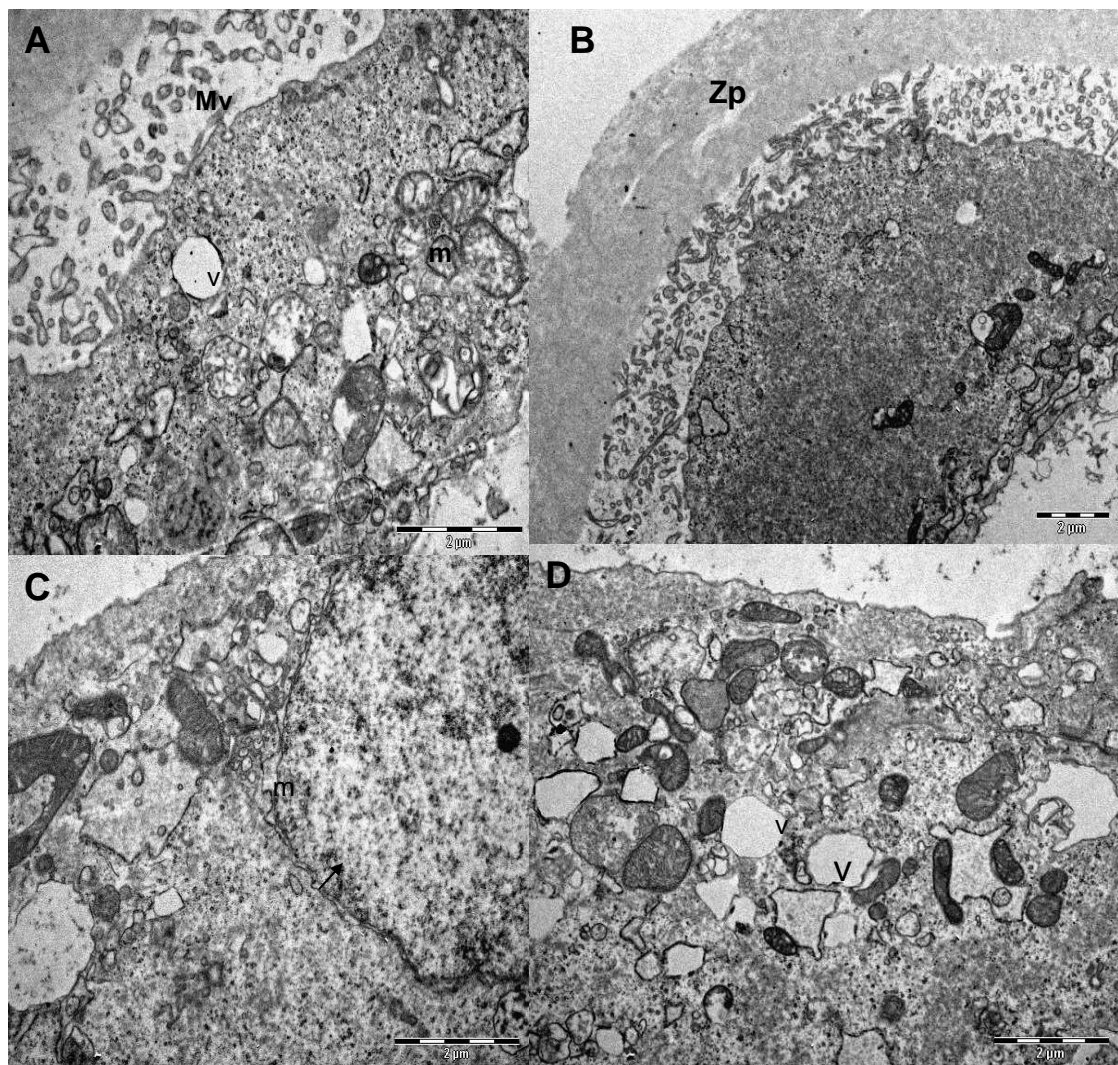
VAJTA ,G.; HOLM, P.; KUWAYAMA , M., et al. Open pulled staw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.51, p.53-58, 1998.

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

YUSWIATI, E.; HOLTZ, W. Successful transfer of vitrified goat embryos. **Theriogenology**, v. 34, p. 629-632, 1990.

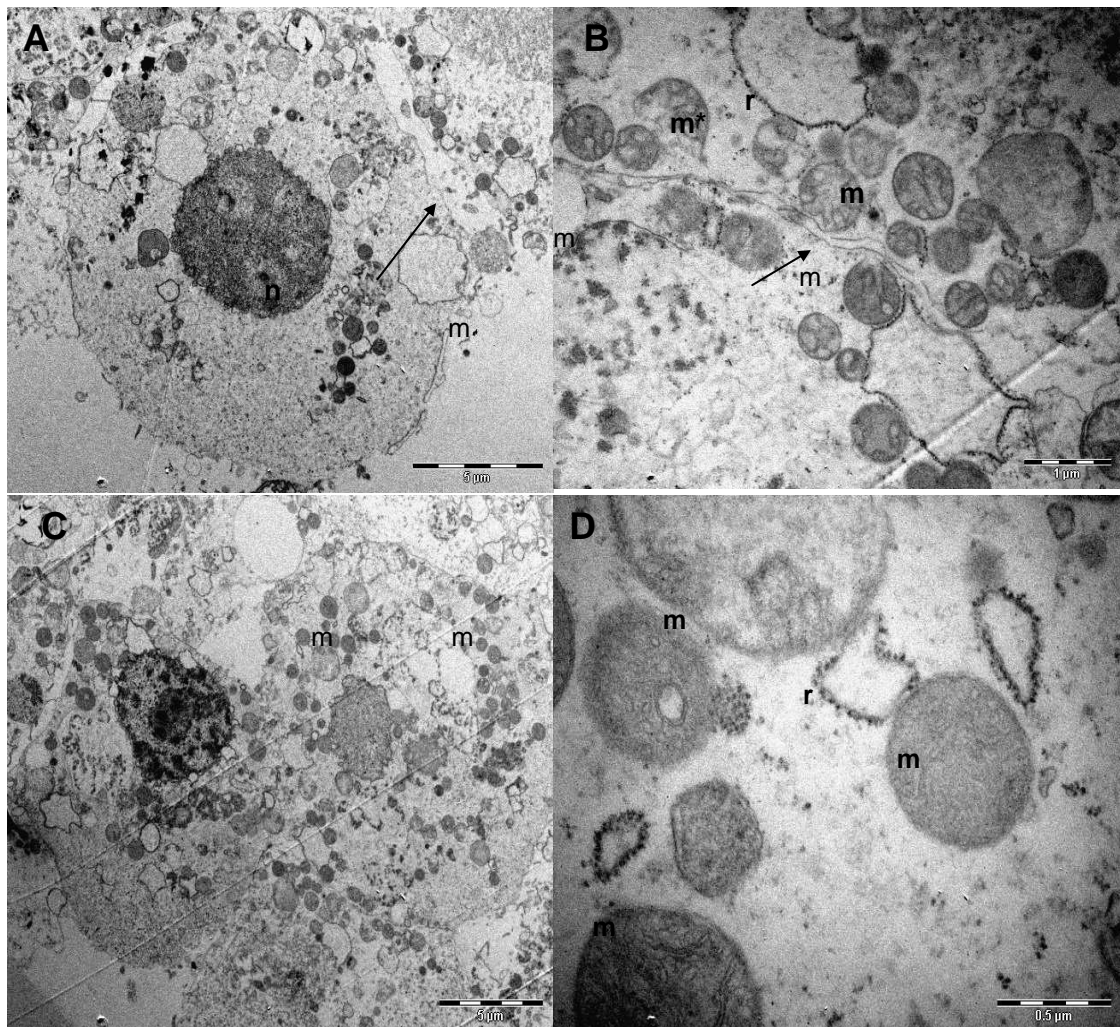
WARE, C.B.; BOLAND, M.P. Effect of varying glycerol and sucrose concentration combination on embryo survival rate in a one-step cryoprotectant removal from frozen-thawed ovine embryos. **Theriogelogy**, v. 27, p. 721-728, 1987.

FIGURAS  
FIGURA 2



• **Figura 2** – Características ultra-estruturais de embriões caprinos criopreservados pelo métodos clássico lento (Grupo controle). A- Mitocôndrias intumescidas e rompidas, diminuição das microvilosidades. B- Zona pelúcida íntegra e presença de microvilosidades. C – Perda das junções comunicantes. D- Presença de vacúolos.

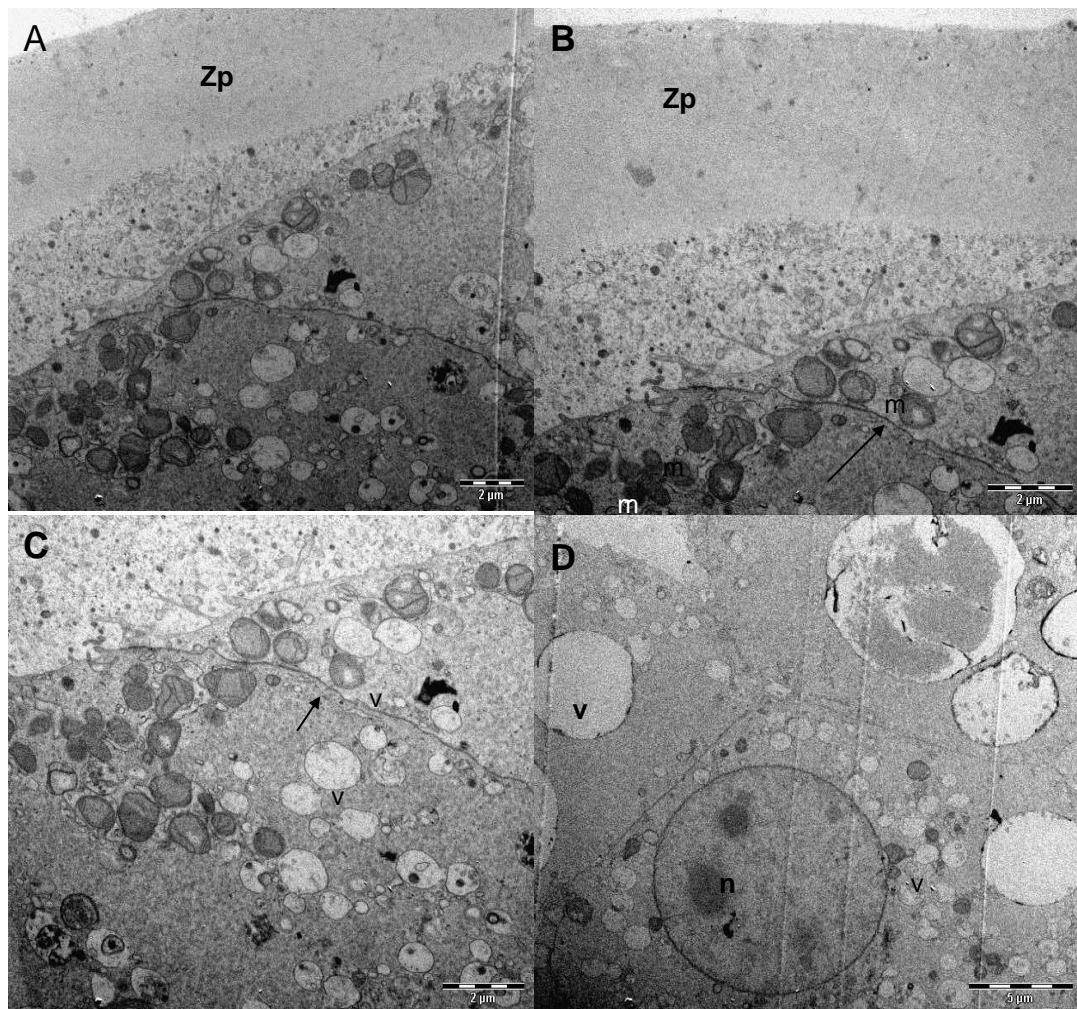
FIGURA 3



• **Figura 3** – Características ultra-estruturais de embriões caprinos criopreservados pela vitrificação (Grupo DF). A – Células com pouca uniformidade, muitas mitocôndrias, perda das junções comunicantes (seta fina), núcleo (n); B – Algumas mitocôndrias intumescidas e rompidas (m\*), perda das junções comunicantes (seta fina); C – Células desorganizadas e muitas mitocôndrias (m); D – Presença de ribossomos (r) e mitocôndrias com suas criptas evidentes.



FIGURA 4



• **Figura 4** – Características ultra-estruturais de embriões caprinos criopreservados pela vitrificação (Grupo DMSO). A – Células com aspecto mais uniforme; B – Presença de Zona Pelúcida (Zp) e mitocôndrias (m); C- Junções comunicantes e presença de alguns vacuolos (v); D – Núcleo (n) organizado e presença de vacuolos (v)

## **CAPÍTULO 2**

# COMPARAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE VITRIFICAÇÃO EM OPS (OPEN PULLED STRAW) SOBRE A VIABILIDADE DE EMBRIÕES OVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO*

P F B de Araújo-Lemos<sup>1</sup>, F F Freitas<sup>2</sup>, LM Freitas Neto<sup>3</sup>, J V de Melo<sup>4</sup>, C Peixoto<sup>4</sup>, M P Pinto<sup>5</sup>, MAL Oliveira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba- EMEPA/PB, Rua Eurípedes Tavares, 210 Tambiá, João Pessoa-PB, Brasil.*

<sup>2</sup>*Médica Veterinária Autônoma*

<sup>3</sup>*Laboratório de Biotécnicas Reprodutivas do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900 Recife-PE, Brazil. Corresponding author. E-mail: [maloufrpe@uol.com.br](mailto:maloufrpe@uol.com.br)*

<sup>4</sup>*Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE, Av. Prof. Luiz Freire, 01. Cidade Universitária - CEP: 50.740-540 - Recife - PE*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, Av. Prof. Luiz Freire, 1000–Cidade Universitária 50740-540 Recife – PE.*

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo identificar os danos causados pela criopreservação de embriões ovinos produzidos *in vivo*, utilizando-se diferentes crioprotetores (etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida) pela avaliação da viabilidade morfológica e ultra-estrutural, taxa de re-expansão em cultivo e a taxa de gestação. Os embriões foram obtidos de ovelhas da raça Santa Inês superovuladas e distribuídos aleatoriamente em três grupos: Grupo Controle - congelamento pelo método clássico - Etilenoglicol (n=55), Grupo DMSO (Dimetilsulfóxido) – vitrificação (n=54) e Grupo DF (Dimetilformamida) – vitrificação (n=55). O grupo controle permaneceu cinco minutos estabilizando na solução de Etilenoglicol (EG) sendo posteriormente envasados em palhetas de 0,25 ml e submetido a congelamento automatizado (TK3000). Os embriões do grupo DMSO foram equilibrados em solução de 10% de EG e 10% de DMSO e transferidos para solução de vitrificação com 20% EG e 20% DMSO + 0,5 sacarose. O grupo DF foi equilibrado em solução de 10% de EG e 10% de DF e depois transferido para solução de vitrificação com 20% EG e 20% DF+ 0,5 sacarose. Todos os grupos foram avaliados por meio da análise da viabilidade embrionária pelo uso de sondas fluorescentes (Iodeto de Propídeo e Hoechst 33342), verificando-se que as

células do grupo controle mantiveram viáveis em todos os embriões analisados, resultado semelhante ocorreu com o grupo DF, 80% das amostras foram consideradas viáveis, diferente do grupo DMSO, que tiveram 50% de viabilidade. O estudo ultra-estrutural dos embriões por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que os achados foram semelhantes entre os grupos controle e DF. Os embriões vitrificados com DF tiveram maiores taxas de sobrevivência *in vitro* (53,33%) e *in vivo* (45%), os vitrificados com DMSO tiveram uma taxa de sobrevivência *in vitro* (26,66%) e *in vivo* (30%), os congelados pelo método clássico obtiveram (33,33%) *in vitro* e (40%) *in vivo*. Estes resultados indicam que, a solução de vitrificação contendo 20% de etilenoglicol + 20% de dimetilformamida é um método promissor para a vitrificação de embriões ovinos produzidos *in vivo*, demonstrando causar menos lesões ao citoesqueleto e as organelas celulares, como isso apresentando um índice de gestação satisfatório.

**Palavras-chave:** Criopreservação, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, gestação, sondas fluorescentes, ultra-estrutura.

#### **ABSTRACT**

This objective of this study was to identify the damage caused by cryopreservation of sheep embryos produced *in vivo*, using different cryoprotectants (ethylene glycol, dimethylformamide and dimethylsulfoxide) through evaluation of the morphological and ultrastructural level of re-expansion of cultivation and the rate of pregnancy. Embryos were obtained from superovulated Santa Ines ewes and randomized into three groups: control group - freezing of classic - Ethylene glycol (n = 55), Group of DMSO (dimethyl sulfoxide) - vitrification (n = 54) and Group DF (Dimethylformamide) - vitrification (n = 55). The control group had five minutes for stabilizing the solution of Ethylene glycol (EG) and embryos were then packed in straws of 0.25 ml and subjected to automated freezing (TK3000). The embryos of group DMSO were mixed in a solution of 10% EG and 10% DMSO and transferred to a vitrification solution with 20% EG and 20% DMSO + 0.5 sucrose. Embryos in group DF had a balanced solution of 10% EG and 10% of DF and were then transferred to a vitrification solution with 20% EG and 20% DF + 0.5 sucrose. All groups were evaluated by analysis of embryonic viability by use of fluorescent probes (iodide propidium and Hoechst 33342). Results indicated that the cells in the control group remained viable in all embryos analyzed, a similar result occurred with the group DF where 80% of samples

were considered viable while the DMSO group presented 50% viability. The ultrastructural study of embryos by transmission electron microscopy showed that the findings were similar between the control and DF. Embryos vitrified with DF had higher rates of in vitro (53.33%) and in vivo (45%) survival, while embryos glazed with DMSO had an in vitro (26.66%) and in vivo (30%) survival rate and frozen embryos obtained by the traditional method showed in vitro (33.33%) in vivo (40%) survival. These results indicate that the glazing solution containing 20% ethylene glycol + 20% dimethylformamide is a promising method for cryopreservation of sheep embryos produced in vivo, demonstrating that it causes less damage to the cytoskeleton and cellular organelles, and that they presented satisfactory pregnancy rates.

**Keywords:** Cryopreservation, dimethylsulfoxide, dimethylformamide, pregnancy rate, fluorescent probes, ultra-structure.

## INTRODUÇÃO

A criopreservação de embriões é uma ferramenta empregada a mais de três décadas (WHITTINGHAM et al., 1972; WILMUT, 1972). Hoje, a criopreservação tornou-se um fator chave na tecnologia de transferência de embriões comerciais e fins de investigação, permitindo o armazenamento de materiais biológicos por tempo indeterminado sem que estes percam a sua atividade funcional nem ocorra alteração genética (WHITTINGHAM, 1980).

Duas grandes metodologias têm sido desenvolvidas, congelamento convencional lento e a vitrificação. O método convencional tem sido amplamente utilizado para a criopreservação de embriões de várias espécies, inclusive de ovinos (COGNIE et al., 2003). Entretanto, ele sofre várias limitações, tais como injúrias pelo frio, danos físicos devido à formação de cristais de gelo, a necessidade de equipamentos elaborados e de altos custos, além do tempo gasto com a curva de congelamento. Em contraste, a vitrificação é caracterizada por processos simplificados, e sem custos com aparelhos (VAJTA e KUWAYAMA, 2006; DIKE, 2009).

A vitrificação tornou-se uma alternativa promissora para a criopreservação de células e de tecidos, e seu sucesso tem aumentado as expectativas em diversas áreas de conhecimento envolvidas com a preservação de gametas e embriões (KULESSHOVA et

al., 2001). Este fenômeno pode ser considerado como um aumento extremo de viscosidade combinado a uma rápida taxa de resfriamento, baseado na desidratação do embrião através de sua breve exposição a soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido (VAJTA, 2000).

Os procedimentos de criopreservação tentam minimizar consequências 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 (DOBRINSKY, 1996).

Os primeiros nascimentos de cordeiros resultantes de embriões criopreservados com congelamento lento foram relatados na década de 70 (BILTON e MOORE, 1976), mas o primeiro nascimento de cordeiros resultantes de um embrião vitrificado foi relatado por Szell et al. (1990). Embriões ovinos vêm sendo vitrificados com sucesso. Isachenko et al. (2003) obtiveram 70 % de prenhez em ovelhas inovuladas com embriões vitrificados em OPS, resultados similar ao obtidos com embriões congelados pelo método tradicional. Em estudo realizado no Brasil com ovinos da raça Santa Inês não foi observada diferença significativa entre a viabilidade dos embriões congelados e vitrificados, porém os resultados foram considerados baixos, sendo a taxa de fertilidade aos 60 dias de 18,2% com embriões congelados e 6,7% com embriões vitrificados (CORDEIRO, 2001).

Diferentes combinações de crioprotetores (etilenoglicol, glicerol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, propilenoglicol) têm sido propostas para vitrificação de células e tecidos biológicos (KASAI et al., 1992).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar os danos causados pela criopreservação de embriões ovinos produzidos *in vivo*, avaliando a viabilidade morfológica e ultra-estrutural, as taxas de re-expansão e de gestação, além de comparar a utilização de diferentes agentes crioprotetores (etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida) na vitrificação de embriões ovinos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local do Experimento**

O experimento foi realizado na Estação Experimental de Pendência localizada no Município de Soledade-PB e na Estação Experimental Benjamin Maranhão, localizada em Campo de Santana-PB, ambas pertencentes à Empresa Estadual de

Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA/PB) e no Laboratório de Biotecnias Reprodutivas do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) e no Departamento de Energia Nuclear (UFPE).

### **Seleção das Doadoras**

Foram utilizadas 30 fêmeas da espécie ovina da raça Santa Inês, apresentando idade média de 3,2 anos, sem distúrbios reprodutivos, e em adequado estado nutricional (escore corporal mínimo de 3) e sanitário. Avaliação das doadoras inclui exames clínico-geral, ginecológico e parasitológico, para evitar a inclusão de animais com condições comprometidas.

Os animais eram mantidos em apriscos cobertos, onde receberam como volumoso a base de feno de tifton *ad libitum*, além de uma suplementação com concentrado com 18% de proteína bruta, contendo milho, soja, trigo e calcário com livre acesso à água e sal mineral.

### **Superovulação e Produção dos Embriões**

As doadoras tiveram os ciclos estrais controlados mediante a inserção de dispositivos vaginais impregnados com 0,33g de progesterona natural, (Eazi-Breed CIDR, Pfizer, Nova Zelândia), no dia 0 do tratamento, considerado no momento da inserção do pessário. No 9º dia foram substituídos por novos dispositivos os quais permaneceram até o 13º dia do tratamento. A superovulação teve início no 11º dia, utilizando 252 mg do hormônio folículo estimulante - pFSH (Folltropin-V, Bioniche, Canadá) divididas em oito doses decrescentes administradas em intervalos de 12 horas. Juntamente à retirada dos dispositivos vaginais ou seja, no 13º dia, foi administrados 200UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG; Novormon, Syntex, Argentina).

Foram realizadas monta natural controlada a partir do 14º dia, com reprodutores comprovadamente férteis.

### **Colheita de Embriões das Ovelhas**

As colheitas foram realizadas entre os 5,5 e o 6º dia após o início do estro, visando obter embriões em estágio de mórula à blastocisto expandido. Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 24 horas e hídrico de 12 horas antes da colheita, recebendo anestesia mediante o emprego de 0,2mg/kg de cloridrato de xilazina

(Rompum, Bayer, Brasil) associada a 7,5 mg/kg de cloridrato de ketamina (Ketalar, Parke-Davis Co./ Argentina), por via intramuscular. Os animais foram contidos em mesa cirúrgica apropriada, em decúbito dorsal com os membros estendidos para realização da tricotomia e anti-sepsia da região abdominal.

As colheitas foram realizadas por laparotomia, através de uma incisão sobre a linha média cranialmente ao úbere, exteriorizando-se o útero para introdução, em cada corno uterino, da sonda de Foley número 10. Próximo à junção uterotubárica introduziu um angiocat 20G por onde injetava-se 40 mL do meio de colheita dos embriões (solução salina fosfatada tamponada - Dulbecco Modificado-DPBS, Embriocare, Cutilab, Brasil), acrescida com 1% de soro fetal bovino à 37° C. A solução de lavagem foi recolhida em placas de Petri plásticas de 100 mm de diâmetro e imediatamente levada ao esteriomicroscópio para os embriões serem identificados e classificados em aumento de 10 e 20X.

Durante a colheita, o útero foi irrigado com solução fisiológica à temperatura de 37° C, com o objetivo de evitar possíveis aderências. O peritônio e o tecido muscular foram suturados com fio “*cat gut*” cromado n°.0 e a pele com fio de “*nylon*” n°.3, em pontos separados simples.

As fêmeas receberam 1 mL/10kg de peso de oxitetraciclina LA (Oxitetra LA, Agener, Brasil) via intramuscular e 0,375 mg de cloprostenol (Prolise, Tecnopec Brasil) por via intramuscular.

### **Avaliação e classificação da morfologia embrionária**

O líquido colhido permaneceu em placas de Petri grande (100x15 mm de diâmetro) com fundo quadriculado para procura dos embriões por meio de esteriomicroscópio a um aumento de 10 a 20x. As estruturas encontradas foram transferidas com auxílio de uma pipeta para placas de Petri de 35 mm, contendo meio de manutenção - TQC Holding Plus (Nutricell, Bioniche/EUA). Os embriões foram avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade seguindo os critérios morfológicos da *International Embryo Transfer Society* - IETS (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998) como embriões de grau I (excelente), II (bom), III (pobre) e IV (morto ou degenerado). Foram selecionados apenas embriões classificados como excelentes (grau I) e bons (grau II), considerando sua forma esférica e suas células com contornos perfeitamente visíveis e coloração homogênea.



## **Criopreservação dos Embriões**

### **Congelação Clássica – *Grupo Controle***

Os embriões foram congelados utilizando congelador automático de embriões (TK 3000, Uberaba, Brasil). Antes da congelação os embriões permaneceram por cinco minutos estabilizando na solução de Etilenoglicol- TqC Ethylene Glycol Freezer Plus (Nutricell, Bioniche/EUA) e envasados em palhetas de 0,25 mL adequadamente identificadas. A coluna contendo o embrião com a solução crioprotetora foi separada por duas colunas com solução de manutenção, e também por duas bolhas de ar de 1,0 cm. As palhetas foram seladas e colocadas no congelador inicialmente programado a uma velocidade de resfriamento de  $-1,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $-6^{\circ}\text{C}$ , a partir da temperatura ambiente. Alcançada a temperatura de  $-6^{\circ}\text{C}$ , o processo de resfriamento foi interrompido por cinco minutos, para a indução da cristalização (“*seeding*”) esperando-se 10 minutos para reiniciar a curva, de modo que, o congelador de embriões foi reprogramado para uma velocidade de congelação de  $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$  até  $-32^{\circ}\text{C}$ . Após 5 minutos de estabilização à temperatura final de congelação, as palhetas contendo os embriões foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  e acondicionadas em “*rack*”, e armazenadas nos botijões criobiológicos.

### **Vitrificação em OPS (Open Pulled Straw) – *Grupo DMSO e Grupo DF***

Todas as soluções para a vitrificação foram preparadas usando a solução base com H-TCM 199 suplementado com 20% de SFB (Solução de manutenção). Os embriões foram expostos primeiramente à solução manutenção por 5 minutos e em seguida nas soluções de vitrificação. Imediatamente após a passagem pela solução de manutenção, os embriões do grupo DMSO foram transferidos a solução de 10% de Etilenoglicol (EG) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) por 1 minuto e em seguida transferidos para de solução de 20% de EG + 20% de DMSO + 0,5M sacarose por 40 segundos no máximo. E para os embriões do grupo DF, os embriões foram transferidos a solução de 10% de Etilenoglicol (EG) e 10% de Dimelformamida (DF) por 1 minuto e em seguida foram transferidos para de solução de 20% de EG + 20% de DF + 0,5M sacarose por 40 segundos no máximo. Em seguida, os embriões foram aspirados em 2 $\mu\text{L}$  da última solução de vitrificação, contendo 1 a 2 embriões e envasados por capilaridade em OPS devidamente identificadas com número da fêmea e classificação do embrião. Imediatamente as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  e

acondicionadas em “*racks*” individuais para cada fêmea e armazenadas em botijões criobiológicos.

### **Descongelamento dos embriões congelados**

Os embriões foram descongelados expondo-se as palhetas à temperatura ambiente por 10 segundos e imersão em banho-maria a 37°C por 20 segundos. O conteúdo das palhetas foi esvaziado em placa de quatro poços, contendo meio de manutenção - TQC Holding Plus, onde permaneceram por 5 minutos, e em seguida era novamente avaliado quanto a sua morfologia e qualidade.

### **Aquecimento dos embriões vitrificados**

Imediatamente após a retirada do nitrogênio líquido, as palhetas foram aquecidas por 3 segundos no ar, e posteriormente a extremidade mais fina submergida em solução de aquecimento. A remoção do crioprotetor dos embriões foi feita em três etapas, numa placa de quatro poços, contendo o meio de manutenção usando a solução base com H-TCM 199 suplementado com 20% de SFB + 0,33 M de Sacarose (Poço 1 e 2) por 1 minuto cada, em seguida no meio de manutenção usando a solução base com H-TCM 199 suplementado com 20% de SFB + 0,2 M de Sacarose, por 1 minuto (Poço 3) e por fim durante 5 minutos, no meio de manutenção usando a solução base com H-TCM 199 suplementado com 20% de SFB

### **Avaliação da viabilidade embrionária**

Os embriões foram incubados por cinco minutos em DPBS acrescido de BSA 1% e 125mg/ml de Iodeto de Propídeo, sendo posteriormente transferidos para gotas colocadas sobre lâmina histológica contendo uma solução de DPBS com 100mg/ml de Hoechst 33342. A preparação foi coberta com lamínula.

Os embriões corados foram examinados em microscópio invertido (Leica DM 4000), filtro azul 535 e 617 nm, equipado com luz fluorescente para a determinação de células vivas e mortas. Os blastômeros que fluoresceram em azul foram considerados viáveis (com membrana plasmática íntegra) enquanto aqueles que fluoresceram em vermelho ou rosa foram considerados inviáveis. Entretanto, embriões com menos de 50% de células vermelhas foram considerados viáveis.

### **Estudo ultra-estrutural dos embriões por microscopia eletrônica de transmissão**

Para a análise ultra-estrutural foram selecionados aleatoriamente 29 embriões, sem prévia avaliação de sua morfologia, sendo o grupo Controle (n=9), grupo DMSO (n=10) e grupo DF (n=10). Os embriões foram fixados em Solução Karnovsky (2 horas, 4 °C), após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão Cacodilato de sódio a 0,1M (pH 7,4) e, posteriormente, foram pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio utilizando o mesmo tampão. Após a desidratação, em séries crescentes de etanol, os embriões foram embebidos em resina Epon. Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante, montados em grade de cobre e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os embriões foram examinados e fotografados em microscópio eletrônico de transmissão (FEI Morgani 268 D, Eindhoven, Netherlands), no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Recife/PE – CETENE.

### **Avaliação das taxas de re-expansão após o aquecimento dos embriões**

Para realização da cultura *in vitro*, os embriões foram aquecidos e avaliados morfológicamente. Os embriões foram cultivados em meio SOF (Nutricell). Utilizamos 400 µl do meio SOF + 400 µl de óleo mineral (Sigma), sob atmosfera composta por 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 38,5°C, contidos em placas de petri de quatro poços, o meio ficou estabilizando (overnight), para posterior cultivo dos embriões, afim de permitir o desenvolvimento embrionário. A capacidade de sobrevivência dos embriões foi avaliada com 6, 12 e 24 horas após a cultura. O critério de viabilidade adotado para todos os grupos consistiu na observação da expansão da blastocelule.

### **Inovulação dos embriões e diagnóstico de gestação**

Foram utilizadas 60 receptoras adultas sem raça definida (SRD) clinicamente híginas e submetidas ao protocolo de indução do estro e da ovulação mediante ao uso de esponjas vaginais com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon-Syntex, Argentina) por um período de 14 dias. No décimo quarto dia foi aplicado 400 UI de eCG concomitante a retirada das esponjas. Vinte e quatro horas após a remoção dos pessários foram introduzidos machos rufiões para detecção do estro. As inovulações foram realizadas por semi-laparoscopia no dia 8 após a retirada do dispositivo vaginal.

As receptoras foram previamente submetidas a jejum hídrico-alimentar de no mínimo 12 horas, realizadas a tricotomia e anti-sepsia do abdômen, seguidas de sedação com 0,05mg/Kg de cloridato de xilosina (Rompum, Bayer). Inicialmente foi avaliada a

resposta ovariana quanto a presença de corpos lúteos funcionais face ao protocolo de indução do estro e ovulação. Em seguida, o corno uterino *ipsis* lateral ao ovário com corpo lúteo foi exteriorizado e perfurado com agulha 40x12, e inserido o “*tomcat*” (Nutricell, São Paulo, Brasil) contendo os embriões para inovulação. Foi inovulado somente um embrião por receptora.

O diagnóstico de prenhez foi realizado 35 dias após a inovulação com equipamento de ultra-sonografia (Mindray, China) e transdutor linear de 5Mhz, por via retal.

### **Análise Estatística**

Para a análise estatística das taxas de re-expansão e taxas de gestação dos embriões foi utilizado o Teste de Qui-quadrado para comparações múltiplas (CURI e MORAES, 1981; FISHER e BELLE, 1993), considerando-se o nível de significância de 5%. Utilizou-se uma análise descritiva para a avaliação da morfologia embrionária pelo uso das sondas fluorescentes e análise ultra-estrutural.

## **RESULTADOS**

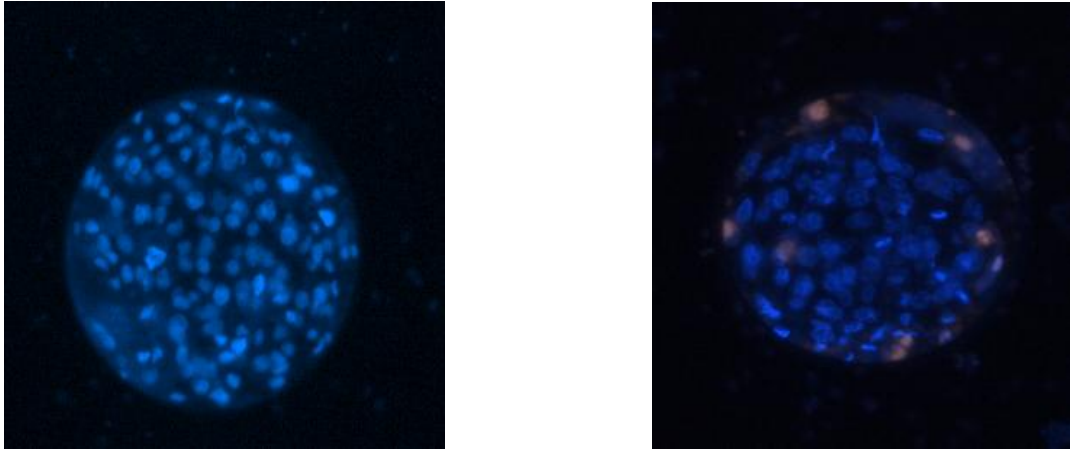
Foram colhidos 186 embriões de 30 doadoras, média de 6,2, dos quais 165 foram selecionados como grau I e grau II, correspondendo a um percentual de 88,7% dos embriões colhidos e distribuídos equitativamente nos três tratamentos.

A viabilidade embrionária foi avaliada pelo uso de sondas fluorescentes, onde utilizamos como corante o iodeto de propídeo e o Hoechst 33342. Os embriões analisados do grupo controle mantiveram suas células integras após o descongelamento, cerca de 30% das células apresentaram-se lesionadas, ou seja, coradas em vermelho, sendo assim, podemos considerar que os embriões analisados todos foram considerados viáveis.

Os embriões do grupo DMSO analisados 33,33% dos embriões estavam com suas células totalmente lesadas, 22,22% apresentaram menos da metade das suas células lesadas e 44,44% dos embriões analisados apresentaram pouca ou nenhuma célula lesionada, sendo assim, 66,66% dos embriões analisados foram considerados viáveis.

No grupo DF, os embriões analisados estavam com 20% das suas células totalmente lesionadas, o restante das amostras, 80% foram considerados viáveis, dos

quais 60% estavam com suas células pouco lesionadas e 20% estavam totalmente íntegras, ou seja, estavam corados em azul.



**Figura 5** – Blastocistos expandidos coletados de ovelhas Santa Inês, corados com Iodeto de Propídeo e Hoechst 33342 e examinados sob microscópio de fluorescência. O embrião da esquerda apresenta 100% de suas células íntegras (azuis) e o embrião da direita, classificado como grau 2, apresentou algumas de suas células da periferia lesadas (vermelhas).

Para a realização da microscopia eletrônica de transmissão (MET), foram avaliados 29 embriões ovinos de excelente e boa qualidade, em estágio de desenvolvimento blastocisto e blastocisto expandido.

Com base nas características morfológicas ultra-estruturais dos embriões podemos observar que as células apresentavam a maioria das organelas íntegras, preservação da zona pelúcida, integridade de membrana plasmática com longas microvilosidades, as quais projetavam-se para o interior da zona pelúcida. As mitocôndrias apresentavam com formas variadas sendo principalmente arredondadas ou alongadas, com criptas evidentes, que estavam distribuídas por todo citoplasma, com tendência a formação de grupos, observou-se o complexo de Golgi, ribossomos, as junções celulares eram visíveis, evidenciando uma organização celular.

Entre as alterações evidenciadas nas estruturas celulares, observamos severas lesões, com uma total desorganização celular, membranas plasmáticas e nucleares irregulares e rompidas, descontinuidade da membrana citoplasmática, com redução do

número e da extensão das microvilosidades, as mitocôndrias demonstraram-se intumescidas e rompidas, presença de muitos vacúolos e perda das junções intercelulares.

Os resultados das características analisadas demonstraram que os embriões do grupo controle e DF, apresentaram menos danos ao citoesqueleto, com uma maior organização celular e preservação das organelas.

Os resultados da taxa de re-expansão dos embriões criopreservados pelos métodos clássico (Controle) e por vitrificação (DMSO e DF) foram mostrados na tabela 3. Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) na taxa de re-expansão entre os grupos controle e DMSO. No entanto, os embriões do grupo DF tiveram uma maior porcentagem na taxa de sobrevivência.

**Tabela 3** – Taxa de re-expansão de embriões ovinos criopreservados pelos método clássico (Controle) e por vitrificação (DMSO e DF).

Grupos	Embriões			
	(n)	6 h	12 h	24h
Controle	15	1 (6,66)	4 (26,66)	5 (33,33) <sup>a</sup>
DMSO	15	2 (13,33)	3 (20)	4 (26,66) <sup>a</sup>
DF	15	4 (26,66)	8 (53,33)	8 (53,33) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Grupos seguidos de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ )

A taxa de gestação das receptoras inovuladas (Tabela 4) com embriões do grupo controle foi de 40%, resultado semelhante foi constatado no grupo DF (45%). Para as receptoras do grupo DMSO o índice de gestação foi de 30%. Não evidenciada diferença significativa na taxa de gestação entre os grupos.

**Tabela 4** - Taxa de gestação após inovulação de embriões ovinos criopreservados pelos métodos clássico (Controle) e por vitrificação (DMSO e DF).

Grupos	Receptoras	Embriões	Taxa de gestação
	(n)	Transferidos (n)	(%)
Controle	20	20	40 <sup>a</sup>
DMSO	20	20	30 <sup>a</sup>
DF	20	20	45 <sup>a</sup>

Grupos seguidos de pelo menos uma letra igual não diferem estatisticamente ( $p>0,05$ )

## DISCUSSÃO

Na avaliação da viabilidade embrionária por meio de sondas fluorescentes (Iodeto de propídeo e Hoechst 33342) foi evidenciado que os embriões submetidos ao processo de criopreservação pelo método clássico (grupo controle) foram considerados todos viáveis, pois apresentavam menos de 50% das células lesionadas após a criopreservação. Sabe-se que a perda da viabilidade embrionária associada com a criopreservação pode ser influenciada pelo tipo e a concentração do crioprotetor utilizado, protocolo de congelamento, o estágio de desenvolvimento dos embriões, a espécie e o genótipo do animal (BETTENCOURT et al., 2009). No presente estudo, a qualidade dos embriões (grau I e II), a curva de congelamento (EOV1), o crioprotetor/concentração (etilenoglicol 1,5 M) exerceram efeito positivo sobre a viabilidade dos embriões criopreservados. Confirmando o efeito benéfico do EG sobre a viabilidade embrionária, por apresentar menos efeito tóxico, uma rápida difusão do equilíbrio dentro da célula, entre a zona pelúcida e a membrana celular, e seu uso pode resultar de melhores taxas de sobrevivência de embriões congelados/descongelados (ALI e SHELTON, 1993).

Sob a mesma avaliação, nos embriões vitrificados utilizando dimetilformamida como crioprotetor, observou-se que a maioria das amostras (77%) encontrava-se com as células íntegras. Corroborando com Fuku et al. (1995), Mukaida et al. (1998), Migshima et al. (2003), Siqueira-Pyles (2006), Baudot et al. (2007) que evidenciaram efeito benéfico na criopreservação de embriões ovinos, bovinos, humanos e camundongos. O crioprotetor DF apresentou um efeito benéfico na criopreservação de embriões, devendo ser melhor explorado. Baudot e Boutron (1998) avaliaram a eficiência da vitrificação utilizando-se o dietilformamida e dimetilformamida em associação com outros crioprotetores e verificaram que estes compostos são comparáveis ao DMSO, mais eficientes do que o glicerol e etilenoglicol e menos eficientes do que o 1,2 propanodiol. Os autores sugerem ainda que estes componentes possam ser novos crioprotetores efetivos.

Por conseguinte, o grupo vitrificado com o DMSO, apresentou cerca de 50% das células embrionárias íntegras. Este crioprotetor preserva a integridade das membranas lipídicas durante o processo de resfriamento e aquecimento. Essa característica faz com que seja o crioprotetor de eleição na vitrificação de células e tecidos, quando comparado a outros crioprotetores de baixo peso molecular (DE LA TORRE e STANLEY, 2007).

A avaliação ultra-estrutural revelou que os embriões criopreservados pelo método clássico com etilenoglicol e vitrificados com dimetilformamida apresentaram as estruturas celulares com menores alterações em suas organelas em comparação com os embriões vitrificados com o dimetilsulfóxido. Concordando com nossos achados, Bettencourt et al. (2009) relataram que a morfologia dos embriões criopreservados com etilenoglicol revelou uma melhor preservação celular do que aqueles tratados com o glicerol. Da mesma forma que observaram que os embriões em estágio de blastocisto apresentaram viabilidade significativamente superior em comparação com os embriões estágio de mórula, independente do crioprotetor utilizado. Dinnyes et al. (2006) relataram que a sobrevivência de embriões após a criopreservação é fortemente influenciada pela idade, estágio de desenvolvimento e qualidade dos embriões, sendo esta última normalmente avaliada pelas características morfológicas dos mesmos.

A análise ultra-estrutural revelou que a maioria dos embriões vitrificados com DMSO apresentou uma desorganização no citoesqueleto, onde os componentes celulares estavam visivelmente alterados, com a membrana plasmática e nuclear irregulares e rompidas, descontinuidade da membrana citoplasmática, com redução do número e da extensão das microvilosidades, as mitocôndrias demonstraram-se intumescida e rompidas, e perda das junções intercelulares. Essas alterações ultra-estruturais são atribuídas à severa desidratação resultante da ação dos crioprotetores. Para evitar a formação cristais de gelo no interior das células durante o processo de vitrificação, é essencial que ocorra uma efetiva desidratação. Portanto, o processo de vitrificação não exclui a ocorrência de danos osmóticos às células, conforme observado por Curcio (2006). A formação de cristais de gelo intracelular é considerada o fator mais prejudicial que pode ocorrer sob condições específicas de congelamento e descongelamento, com influência negativa na recuperação e sobrevivência de células embrionárias, causando fratura de zona pelúcida, alterações intracelulares de organelas, no citoesqueleto e contatos juncionais (MASSIP et al., 1989; DOBRINSKY, 1996; VAJTA 2003; VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

O citoesqueleto, uma complexa rede de microfilamentos de actina e microtúbulos formados pela polimerização de tubulina, tem um importante papel na fisiologia das células embrionárias, através da manutenção da sua estrutura, formato, força mecânica e da regulação da divisão celular e movimentos. No entanto, a criopreservação tem um efeito deletério para o citoesqueleto e, por conseguinte, na sobrevivência dos embriões. Enquanto os crioprotetores tendem a despolimerizar os



microtúbulos e microfilamentos, o resfriamento pode causar a ruptura total do citoesqueleto (DINNYES et al.,2006).

A criopreservação de embriões tornou-se um método amplamente utilizado na transferência de embriões, porque a taxa de sobrevivência ao congelamento/descongelamento é quase comparável com embriões frescos (SHAW et al.,2000). No entanto a criopreservação pelo método lento é um processo que expõe o embrião a diferentes fatores físicos, químicos e biológicos. Estes fatores podem causar o rompimento da zona pelúcida, membranas celulares ou citoesqueleto e distúrbios metabólicos. Estes danos celulares levam à perda do autocontrole da célula e eventualmente a sua morte por apoptose ou necrose (BAGUISI et al., 1999).

As células são sensíveis ao choque osmótico, assim, crioprotetores mais eficientes como o DMSO E EG quando adicionados ao meio de criopreservação, minimizam o estresse osmótico. Os crioprotetores mais eficientes são altamente hidrofílicos devido à presença de grupos químicos que formam fortes pontes de hidrogênio com a água, por exemplo, os sulfóxido (DMSO). Por este motivo, muitos crioprotetores também protegem as células e suas proteínas contra a desidratação e destruição térmica. Tais crioprotetores permeáveis tornam a membrana celular mais plástica e ligam-se à água intracelular prevenindo a desidratação excessiva e formação de grandes cristais de gelo, reduzindo a toxicidade dentro da célula (SANTOS et al.,2006).

Os embriões vitrificados com DF conseguiram uma taxa de re-expansão em 55,33%, apresentando índices numericamente superiores quando comparados aos demais grupos, controle (33,33%) e DMSO (26,66%). Relatos na literatura divulgam índices variados de taxas de desenvolvimento embrionário *in vitro* após criopreservação tanto pelo clássico como por vitrificação, independente do crioprotetor utilizado. Martinez e Martkovic (1998) trabalhando com embriões ovinos alcançaram média de 75,4% no desenvolvimento de embriões criopreservados pelo método clássico utilizando etilenoglicol, superiores aos obtidos no estudo, entretanto, as taxas de eclosão foram de 52,8%. Resultados semelhantes aos do nosso estudo foram relatados por Nicola et al. (1999) avaliando o desenvolvimento *in vitro* de embriões suínos criopreservados pelo método clássico com a adição de trealose aos meios de criopreservação (etilenoglicol-controle, etilenoglicol + trealose, glicerol + trealose,) chegaram a concluir que a trealose contribui significativamente para o desenvolvimento dos embriões, ao compararem os resultados do grupo controle com os demais grupos,

no entanto, não observaram diferença significativa para os índices de desenvolvimento embrionário dos grupos criopreservados com etilenoglicol e glicerol adicionados com trealose, 28,1 e 28,5%, respectivamente. Os autores atribuíram o resultado positivo obtido com a adição de trealose aos meios de criopreservação provavelmente pela manutenção da flexibilidade da membrana plasmática, o que foi também verificado por Crowe et al. (1987). Porém, nenhum embrião sofreu eclosão após o período de cultivo (18 – 24 horas), fato que os autores atribuíram ao meio de cultivo 199, sugerindo não ser meio ideal para embriões suínos.

Werlich (2005) demonstrou que a associação de etilenoglicol + dimetilsulfóxido proporcionou melhor taxa de eclosão (50,1 a 56,0%), em comparação ao grupo de embriões vitrificados com a associação de etilenoglicol + glicerol (38,9%). O autor relata que, ao empregar glicerol, a exposição e a remoção devem ser de forma mais gradual possível. No seu estudo, tanto a adição como a remoção do glicerol aconteceu em três passos e, segundo o autor, este fato pode ter contribuído para os baixos índices de eclosão dos embriões. Kuwayama et al. (1994) atingiram média de 83,3% nas taxas de desenvolvimento de embriões bovinos vitrificados adicionando glicerol gradualmente em 16 passos. Conforme relatos dos autores, a existência de distorção da zona pelúcida e excessiva retração dos blastômeros, que não sobreviveram, foram observados quando da adição ao glicerol em três passos. Assaf e Rodrigues (2006) conseguiram índices de 39,13% no desenvolvimento *in vitro* com embriões de camundongos vitrificados com 9,0 M de etilenoglicol e envasados em fios de teflon (volume 1 $\mu$ L) e apenas 19,82% para os embriões envasados em eppendof (volume 3 $\mu$ ). Para os autores, a rápida permeação do etilenoglicol para o interior das células durante um curto período de exposição pode ter acontecido ao envasar os embriões com menor volume do crioprotetor.

A variabilidade entre os resultados citados na literatura e que muitas vezes são contraditórios, reforçam a possível interferência de fatores como: meios de cultivo, metodologias de criopreservação, formulação das soluções ou mesmo a procedência dos embriões (Werlich, 2005). Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho, de acordo com as condições as quais foram desenvolvidas, vêm adicionar informações que podem contribuir para futuras pesquisas que visam aprimorar os resultados dos índices de sobrevivência embrionária *in vitro* e *in vivo*.

Estudos com ovinos foram os primeiros nos quais a congelação de embriões foi experimentalmente pesquisada (WILLADSEN et al., 1976). Pesquisas subsequentes têm

mostrado que as taxas de sobrevivência *in vivo* relatadas para diferentes técnicas de criopreservação de embriões em diferentes raças têm sido geralmente baixas e altamente variáveis (21 a 73%) (MCGINNIS et al., 1989; SONGSASEN et al., 1995). As taxas de gestação constatadas estão de acordo com o encontrado por Lopes Júnior (2005), os quais trabalhando com ovelhas Morada Nova verificaram uma taxa de fertilidade de 42,9% após inovulação de embriões congelados/descongelados com etilenoglicol, estando, portanto, consistentes com a taxa de gestação de 35 a 55% que podem ser esperadas utilizando um protocolo padrão de congelação (FAHNING e GARCIA, 1992). Diversos estudos têm demonstrado que o etilenoglicol é o crioprotetor mais efetivo para o processo de congelação de embriões ovinos (SONGSASEN et al., 1995; COCERO et al., 1996).

A taxa de gestação observada em todos os grupos experimentais revelou que as receptoras inovuladas com embriões vitrificados em dimetilformamida apresentaram numericamente, maior índice de prenhez (45%) versus 40% e 30% para as receptoras inovuladas com embriões criopreservados pelo método clássico com etilenoglicol e vitrificado com dimetilsulfóxido, respectivamente. Este resultado certamente pode ser atribuído à qualidade superior dos embriões, conforme já evidenciado pela viabilidade embrionária elucidada pelas sondas fluorescentes, avaliação ultra-estrutural das organelas celulares embrionárias para o grupo Controle e DF.

Estes resultados foram semelhantes aos relatados por Cocero et al. (2002) após inovulação de blastocistos criopreservados pelo método clássico com etilenoglicol (40%), porém outros autores obtiveram índices menores (30%) para embriões em estágio de mórula. Segundo, Martinez e Matkovic (1998) melhores resultados quanto à taxa de prenhez foram obtidos utilizando-se etilenoglicol quando comparado ao glicerol em protocolo tradicional de congelação de mórulas (59,4 vs 29,7%). Dattena et al. (2001), obtiveram taxa de sobrevivência embrionária de 59% após a transferência de embriões vitrificados em OPS. Outros autores também não obtiveram diferença para as taxas de gestação com o uso de embriões criopreservados pelo método clássico com etilenoglicol e vitrificados com glicerol e etilenoglicol ou dimetilsulfóxido e etilenoglicol (DATTENA et al., 2004). Para os autores o uso de crioprotetores altamente permeável individualmente ou como parte de uma mistura tem sido sugerida para reduzir os danos osmóticos no aquecimento e evitar a necessidade de diluição de várias etapas antes da transferência dos embriões.

Resultados semelhantes foram relatados por Green (2007) para taxas de gestação após transferência de embriões criopreservados pelo método clássico – etilenoglicol 3 etapas (36%) e 44,4% para embriões vitrificados com etilenoglicol e dimetilsulfóxido. A autora obteve para os embriões transferidos a fresco, índices de 50%, sendo considerados baixos segundo a literatura, que indica uma taxa de prenhez de embriões produzidos *in vivo* e inovulados a fresco variando de 70 a 90% (DATTENA et al., 2004). Para Green (2007) os baixos resultados encontrados foram decorrentes, possivelmente, de fatores inerentes às receptoras. Uma vez que a condição das receptoras à transferência de embriões, principalmente no tocante à nutrição e sanidade, é responsável por 50% da taxa de prenhez, sendo os outros 50% diretamente dependentes da qualidade embrionária (THIBIER e NIBART, 1992). No presente estudo, o efeito receptora pode ter interferido na resposta à taxa de gestação, pois segundo análises realizadas, a qualidade dos embriões tanto morfológica e ultra estruturalmente demonstrou viabilidade embrionária.

Embora os resultados da criopreservação de embriões ovinos pelo método de congelação tradicional sejam satisfatórios e consistentes, este processo tem como inconveniente à necessidade de um instrumental de custo elevado e um longo tempo para sua realização (BARIL et al., 2001). O uso de técnicas de criopreservação ultra rápidas como a vitrificação pode ajudar a reduzir os custos, pois esta não necessita de equipamentos especiais podendo ser adaptada facilmente a rotina de campo. Ao mesmo tempo, a vitrificação poderia ser utilizada como alternativa para aumentar a criotolerância de embriões cujo resultado com a congelação tradicional não é satisfatória, como embriões em estágio recente de desenvolvimento e embriões produzido *in vitro* (GREE, 2007).

A eficácia da vitrificação OPS é aumentada ainda mais pelo contato direto dos embriões com a solução de descongelamento. Ela diminui sua exposição a tóxicos, bem como outros efeitos adversos sobre os embriões. Tal reidratação dos embriões ocorre imediatamente após a imersão em solução de descongelamento (VAJTA et al, 1997, 1998). Outro benefício da OPS é uma redução significativa ou completa eliminação da fratura da zona pelúcida, o que é comum nos embriões congelados convencionalmente.

Uma desvantagem dos sistemas abertos é o potencial risco de contaminação do meio de vitrificação e dos embriões ao terem contato direto com o nitrogênio líquido (KUWAYAMA et al., 2005). Estudos relataram a contaminação dos embriões bovinos após o armazenamento em nitrogênio líquido (BIELANSKI et al., 2000), assim como a contaminação cruzada entre as amostras (BIELANSKI et al., 2003).

A estratégia de vitrificação tem sua principal diferença em relação à congelação pela taxa de resfriamento. Uma baixa taxa de resfriamento permite manter um balanço ténue entre vários fatores, que pode resultar em danos celulares, pela formação de cristais de gelo, efeito tóxico dos crioprotetores, eletrólitos intracelulares, fratura da zona pelúcida, crio-injúrias e alterações intracelulares de organelas, citoesqueleto e contatos juncionais (DOBRINSKY, 1996).

## **CONCLUSÕES**

A associação de etilenoglicol + Dimetilformamida, foi a associação de crioprotetores que apresentou melhor viabilidade embrionária, demonstrando causar menos lesões ao citoesqueleto e as organelas celulares, como isso apresentando um índice de gestação satisfatório.

Associados as vantagens e diante dos resultados obtidos, sugere-se a utilização da vitrificação com alternativa para criopreservação de embriões ovinos produzidos *in vivo*, dinamizando a técnica e o protocolo, podendo ser usado como rotinas nos programas de transferência de embriões.

## REFERÊNCIAS

ALI, J.; SHELTON, J.N. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 471-477, 1993.

ASSAF, S.S.; RODRIGUES, J.L. Vitriificação de embriões *Mus domesticus* contidos em volumes diferentes de 9,0 M de etileno glicol. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 13, p. 131-136, 2006.

BARIL, F.; TRALDI, A-S.; COGNIÉ, Y.; LEBOEUF, B.; BECHERS, J.F.; MERMILLOD, P. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. **Theriogenology**, v.56, p.147-155, 2001.

BAUDOT A.; BOUTRON, P. Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide. **Cryobiology**, v.37, p.187- 199, 1998.

BAUNOT, A.; COURBIERE, B.; ODAGESCU, V.; SALLE, B.; MAZOYER, C.; MASSARDIER, J.; LOMAGE, J. Towards whole sheep ovary cryopreservation. **Cryobiology**, v.55. p. 236-248, 2007.

BETTENCOURT, E.M.V.; BETTENCOURT, C.M.; SILVA, J.N.C.E.; FERREIRA, P.; MATOS, C.P.; OLIVEIRA, E.; ROMÃO, R.J.; ROCHA, A.; SOUSA, M. Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved in vivo produced ovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, p. 947-958, 2009.

BILTON, R. J.; MOORE, N. W. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 29, p. 125, 1976.

COCERO, M.J.; SEBASTIAN, A.L.; BARRAGAN, M.L.; PICAZO, R.A. Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. **Cryobiology**, v. 33, p. 502-507, 1996.

COCERO, M.J.; MORENO DÍAZ DE LA ESPINA, S.; AGUILAR, B. Ultrastructural Characteristics of Fresh and Frozen-Thawed Ovine Embryos Using Two Cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1244-1258, 2002.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryos technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v.59, p.171-188, 2003.

CORDEIRO, M. F. Produção e criopreservação de embriões ovinos da raça Santa Inês. 2001, 60p. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária. Fortaleza, 2001, 60p.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; AURELL WISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, v.242, p.1-10, 1987.

CURCIO, B.da R. Vitriificação de oócitos imaturos de eqüinos: Características morfológicas ultra-estruturais e maturação nuclear in vitro. **Tese** (Doutorado) –

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006. 62f.

DE LA TORRE, J. C.; STANLEY, W.J. Pharmacology of dimethyl sulfoxide: an update. **Cryobiology**, v.55, p. 351, 2007.

DATTENA, M.; ISACHENKO, V.; ALABART, J.L.; FOLCH, J.; ACCARDO, C.; CAPPAL, P. Comparasion between two embryo transfer methods of vitrified sheep blastocysts. In:Proc 17 th Mtg Ass Eur Trans Emb (AETE), (abstract), 2001.

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

DIKE, I.P. Efficiency of intracellular cryoprotectants on the cryopreservation of sheep oocytes by controlled slow freezing and vitrification techniques. **Journal of Cell and Animal Biology**, v. 3, p. 44-49, 2009.

DINNYES, A., MENG, O., POLGAR, Z., BOONKSOL, D., SOMFAI, T. Criopreservação de embriões mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. Supl. 1, p.171-190, 2006.

DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v.45, p.17-26, 1996.

FAHNING, M.L.; GARCÍA, M.A. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. **Cryobiology**, v. 29, p. 1-18, 1992.

FUKU, E.; XIA, L.; DOWNEY, B.R. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v.32, p.139-156, 1995.

GREE, R.E. Viabilidade de embriões ovinos vitrificados ou congelados submetidos às técnicas direta e indireta de inovulação. **Dissertação** (mestrado em Ciência Veterinária)-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007, 63p.

ISACHENKO, V.; ALABART J.L.; DATTENA M.; NAWROTH, F.; CAPPAL P.; ISACHENKO, E.; COCERO, 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.

KASAI, M.; NISHIMORI, M.; ZHU, S. E.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. Survival of mouse morulae vitrified in na etylene glycol-based solution after exposure to the solution at various tempertatures. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 1134-1139, 1992.

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.

KUWAYAMA, M.; FUJIKAWA, S.; NAGAI, T. Ultrastructure of IVM-IVF bovine blastocysts vitrified after equilibration in Glycerol 1,2- Propanediol using 2-step and 16-step procedures. **Cryobiology**, v. 31, p. 415-422, 1994.

LOPES JÚNIOR, E. S. Colheita, criopreservação e transferência de embriões ovinos da raça Morada Nova (variedade branca) em programa de preservação. **Tese** (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará Faculdade de Medicina Veterinária, Fortaleza, 2005, 142p.

MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Cryopreservation of ovine embryos: Slow freezing and vitrification. **Theriogenology**, v.49, p. 1039-1049, 1998.

MASSIP, A. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 117-129, 1989.

MCGINNIS, L.K.; DUPLANTIS, S.C.; WALLER, S.L.; YOUNGS, C.R. The use of ethyleneglycol for cryopreservation of sheep embryos. **Theriogenology**, v. 31, p. 226 (abstract), 1989.

MIGISHIMA, F.; SUZUKI-MIGISHIMA, R.; SONG, S.; KURAMOCHI, T.; AZUMA, S.; NISHIJIMA, M.; YOKAYAMA, M. Successful Criopreservation of Mouse Ovaries by Vitrification. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 881-887, 2003.

MUKAIDA, T.; WADA, S.; TAKAHASHI, K.; PEDRO, P.B.; AN, T.Z.; KASAI, M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable condition for 8-cell mouse embryos. **Human Reproduction**, v. 13, p. 2874-2879, 1998.

NICOLA, E.S.; DESCHAMPS, J.C.; MACEDO JÚNIOR, M.; BOZATO SOBRINHO, J. Criopreservação de embriões de suínos adicionando trealose aos crioprotetores etilenoglicol ou glicerol. **Ciência Rural**, v. 29, p. 111-115, 1999.

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SILVA, J. R.V.; CELESTINO, J.J. de O.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; MELO, M. A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. **Brazilian Journal of veterinary Research and Animal Science**, v. 43, p. 250-255, 2006.

SHAW, J.M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59-72, 2000.

SIQUEIRA –PYLES, E.S.C. Vitrificação de ovócitos e embriões bovinos utilizando-se etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida como agentes crioprotetores. **Tese** (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006, 116p.

SONGSASEN, N.; BUCKRELL, B.C.; PLANTE, C.; LEIBO, S.P. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. **Cryobiology**, v.32, p. 78-91, 1995.



STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. (Eds). **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões: um guia de procedimento e informações gerais para uso em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários.** Illinois: Savoy, 1998. 180p.

SZELL, A.; ZHANG, J.; HUDSON, R. Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at -180°C. **Reproduction Fertility and Development**, v. 2, p. 613-618, 1990.

THIBIER, M.; NIBART, M. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. **Animal Reproduction Science.**, v.28, p.139-148, 1992.

VAJTA, G. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 357-364, 2000.

VAJTA, G. Vitrification of domestic animal embryos. In: Proceedings from the 5<sup>th</sup> World Conference of A-PART (The International Association of Private Assisted Reproductive Technology Clinics and Laboratories), 23-25 October 2003, Tokyo, Japan, 133-138.

VAJTA,G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservayion systems. **Theriogenology**, v.65, p. 236-244, 2006.

WERLICH, D.E. Diferentes soluções crioprotetoras na vitrificação de embriões bovinos PIV com ou sem o uso de nitrogênio super-resfriado. **Dissertação** (mestrado) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2005, 25p.

WHITTINGHAM, D. G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos by frozen to -196° and -296° . **Science**, v. 178, p. 411-414 , 1972.

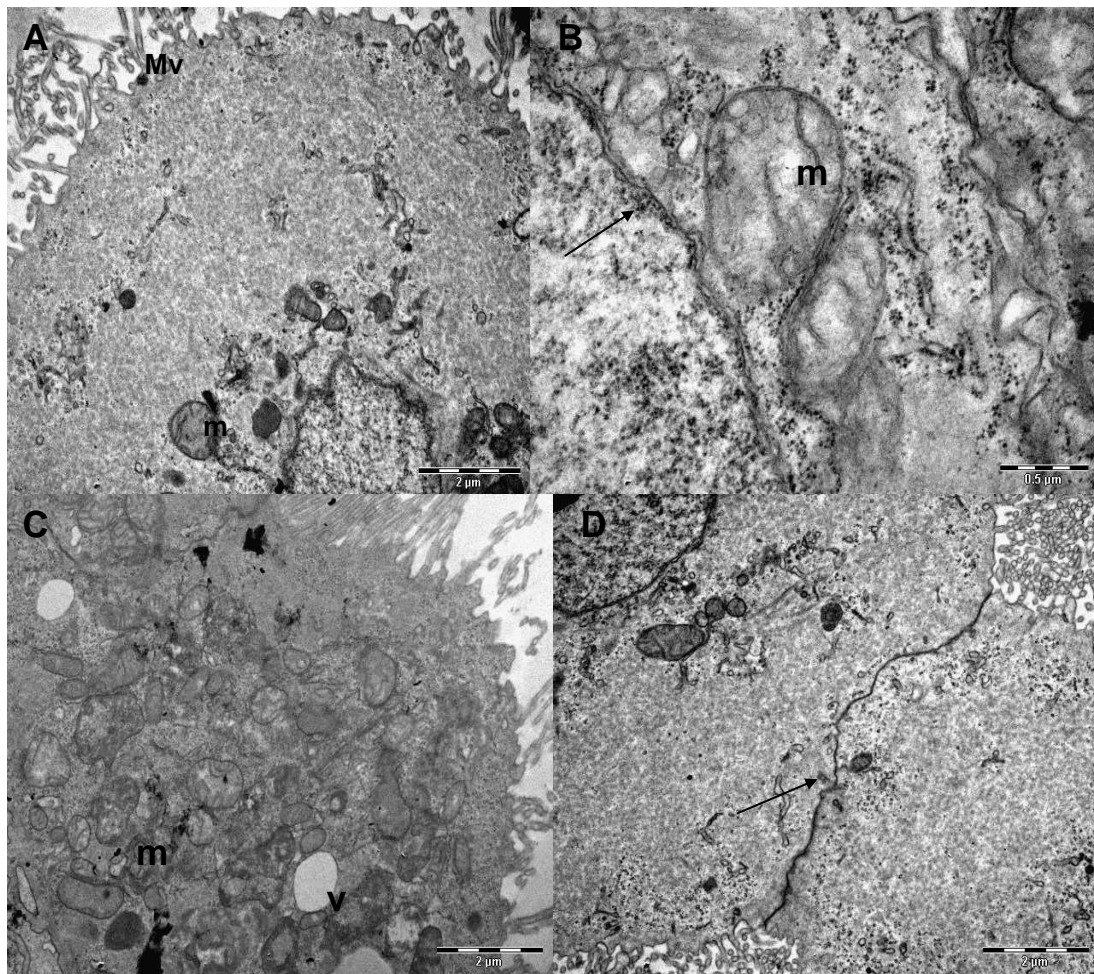
WHITTINGHAM, D.G. **Principles of embryo preservation.** In: Ashwood-Smith MJ, Farrant J (eds), Low Temperature Preservation In Medicine and Biology. Uk; Pitman Medical Ltda., p. 65-83, 1980.

WILLADSEN, S.M.; POLGE, C.; ROWSON, L.E.A.; MOOR, R.M. Deep freezing of sheep embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 46, p. 151-154, 1976.

WILMUT I. The effect of cooling rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. **Life Science**, v. 11, p. 1071-1079, 1972.

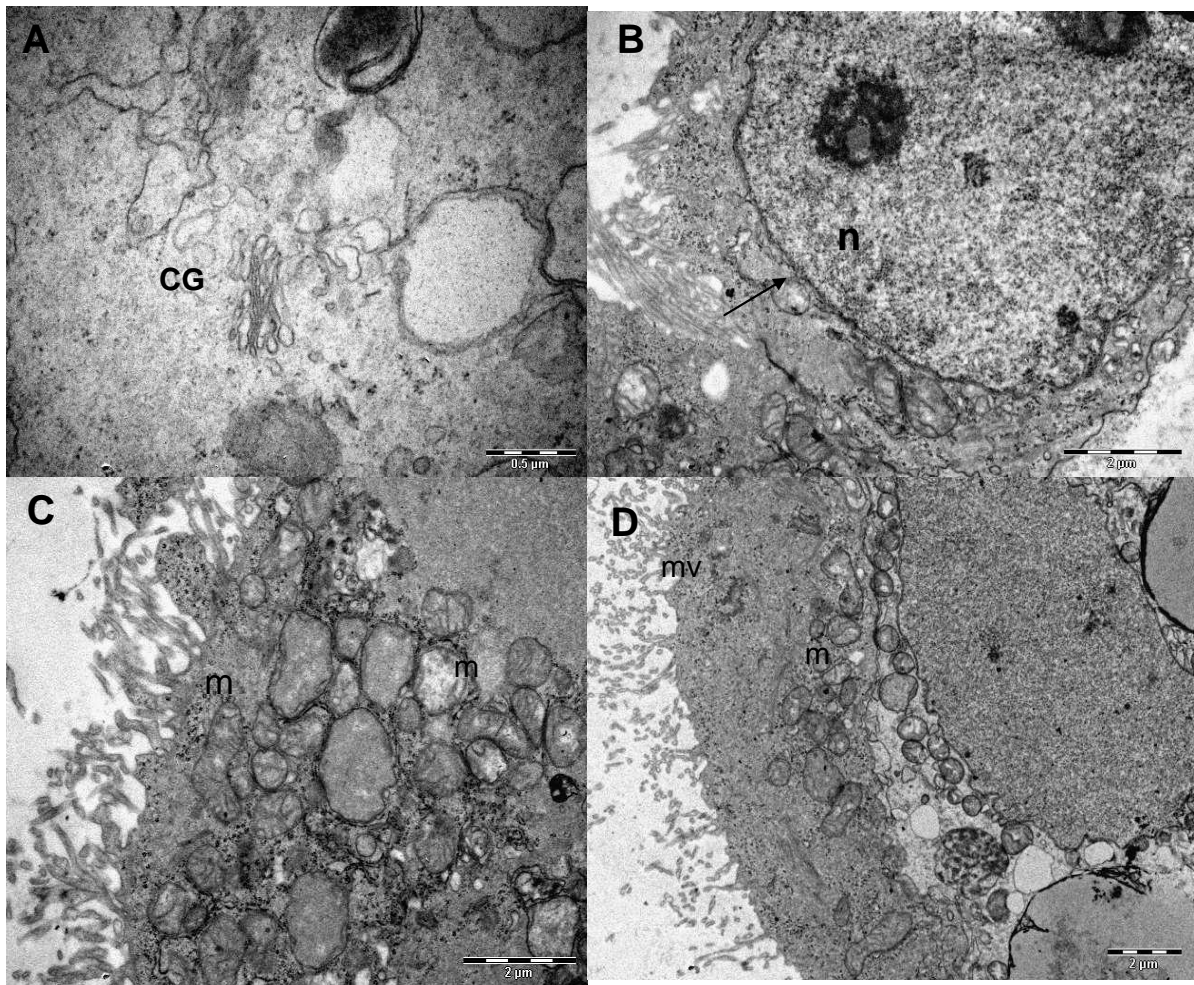
FIGURAS

FIGURA 6



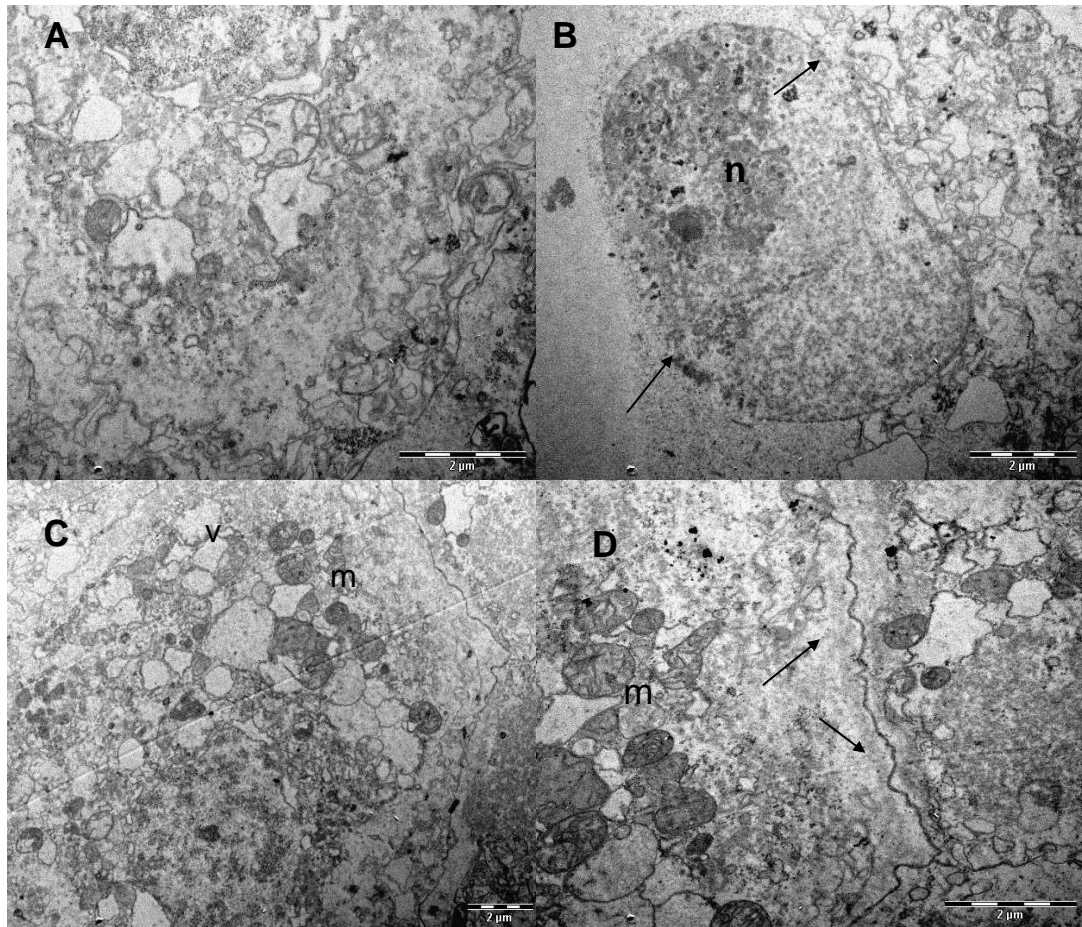
• **Figura 6** - Características ultra-estruturais de embriões ovinos criopreservados pelo métodos clássico lento (Grupo controle). **A**- Presença de microvilosidades e algumas mitocôndrias; **B**- Mitocôndrias (m) e presença das junções comunicantes (seta fina); **C** – Mitocôndrias (m) e vacúolos (v); **D**- Junções comunicantes (seta fina)

**FIGURA 7**



• **Figura 7** - Características ultra-estruturais de embriões ovinos criopreservados pela vitrificação (Grupo DF) **A-** Complexo de Golgi (CG) e algumas mitocôndrias; **B-** Núcleo (n) e membrana nuclear (seta) íntegros.; **C** – Mitocôndrias (m); **D-** Microvilosidades e algumas mitocôndrias.

**FIGURA 8**



• **Figura 8** - Características ultra-estruturais de embriões ovinos criopreservados pela vitrificação (Grupo DMSO) **A**- Célula totalmente desorganizadas, com graves lesões; **B**- Núcleo (n) com membrana nuclear rompida (setas); **C** – Mitocôndrias (m) e vacuolos (v); **D**- Mitocôndrias e presença das junções comunicantes (setas).

## **ANEXOS**

### **- Meio de Manutenção – HM**

- TCM 199 (Nutricell) 8,0 ml
- SFB (Nutricell) 2,0 ml

### **- Solução de sacarose a 0,5M – SM**

- TCM 199 (Nutricell) 40 ml
- Sacarose (Sigma – S3929) 17,115 g

\* Dissolver em banho maria a 40°C.

### **- Preparo da placa para vitrificação**

- Poço 1: 800µl HM
- Poço 2: 800µl HM
- Poço 3: 800µl HM + 100µl EG + 100µl DMSO ou DF
- Poço 4: 600µl SM + 200µl EG + 200µl DMSO ou DF

### **- Preparo da placa para aquecimento dos embriões vitrificados**

- Poço 1: 800µl HM + 400µl SM
- Poço 2: 800µl HM + 400µl SM
- Poço 3: 800µl HM + 200µl SM
- Poço 4: 800µl HM