



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Alane Pains Oliveira do Monte

**ADIÇÃO DE SACAROSE NA SOLUÇÃO CRIOPROTETORA DE VITRIFICAÇÃO  
DE EMBRIÕES OVINOS DORPER PRODUZIDOS *IN VIVO***

Petrolina – PE  
2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Alane Pains Oliveira do Monte

**ADIÇÃO DE SACAROSE NA SOLUÇÃO CRIOPROTETORA DE VITRIFICAÇÃO  
DE EMBRIÕES OVINOS DORPER PRODUZIDOS *IN VIVO***

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mabel Freitas Cordeiro

Petrolina – PE  
2013

Monte, Alane Pains Oliveira do

M757a      Adição de sacarose na solução crioprotetora de vitrificação de embriões ovinos Dorper produzidos *in vivo* / Alane Pains Oliveira do Monte Petrolina, 2013.

XV; 71f: il. 29cm.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior

1. Ovinos – Reprodução. 2. Embriões ovinos. 3. Criopreservação I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco

CDD 636.39

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca  
SIBI/UNIVASF

Bibliotecário:





UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Folha de Aprovação

Alane Pains Oliveira do Monte

**ADIÇÃO DE SACAROSE NA SOLUÇÃO CRIOPROTETORA DE VITRIFICAÇÃO  
DE EMBRIÕES OVINOS DORPER PRODUZIDOS *IN VIVO***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

---

Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior  
Professor Adjunto – Colegiado de Medicina Veterinária  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

---

Profa. Dra. Adriana Gradela  
Professora Adjunta – Colegiado de Medicina Veterinária  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

---

Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos  
Professora Adjunta – Colegiado de Medicina Veterinária  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Petrolina  
2013

“Todas as coisas cooperam  
para o bem daqueles que amam  
a Deus” (Bíblia Sagrada)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, primeiramente pela minha existência, pela saúde, força, proteção concedida e por tornar possível a execução desse projeto em minha vida, que foi projetado antes por Ele.

A minha mãe, que sempre me ajudou e me apoiou em qualquer que fosse a situação em que eu estivesse, sempre torceu e, mais que isso, orou pra que todos os meus projetos dessem certo, estando sempre perto quando precisei.

A meu pai, sempre me apoiando e me ensinando com seu jeito sereno a lidar com diversas situações de forma racional e efetiva.

A meus irmãos, que sempre me ajudaram, tornando os momentos difíceis em sorrisos, abraços e aprendizado e me apoiaram em todas as circunstâncias.

A meus tios, primos, avós, sobrinho e cunhados, que me apoiaram, aconselharam e ajudaram sempre.

A meu marido, que me ajudou de forma efetiva, aceitou minha ausência em momentos importantes, cuidou da pessoa mais importante da minha vida quando eu precisei, ouviu e consolou minhas lágrimas e se alegrou em todos os meus sorrisos.

A minha filha, que, tão pequenina, suportou e compreendeu minha ausência, me deu força para continuar com seu sorriso milagroso e sua alegria incondicional e me ensinou como a felicidade é simples.

Ao meu orientador, pai, amigo, irmão, e colega que me ensinou tudo que sei fazer, profissionalmente falando e, mais que isso, me ensinou muito sobre a vida, a quem eu serei eternamente grata.

À equipe do Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal - LAFIBRA, que não só ajudou, mas tornou possível a execução desse projeto, trabalhando com dedicação e profissionalismo e me ensinaram a melhor forma de trabalho em equipe que pode existir.

À Empresa Baiana de Desenvolvimento Agropecuário EBDA, que acreditou em nosso projeto e nos deu carta branca para trabalhar em suas instalações com todo apoio que precisávamos.

À UNIVASF, que me tornou Médica Veterinária e, agora, Mestre em Ciência Animal, além de me ter como corpo técnico da instituição, sendo responsável por todos os aspectos da minha carreira profissional.

Aos professores do Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal - CPGCA, pelo amplo conhecimento passado nas diversas áreas, o que tornou possível um aproveitamento intenso do curso.

Aos colegas do mestrado, principalmente aos do LAFIBRA, Mayara, João Bosco e Lívia, que foram parceiros efetivos na caminhada.

As minhas amigas Keidy, Valéria, Jusciene, Raquel, Vanessa Raquel, Vanessa Santos e Tainã, pelos ensinamentos, risadas, discussões, brincadeiras, trabalhos realizados e todas as coisas que as melhores amigas do mundo poderiam fazer por mim.

Obrigado a todos que participaram direta ou indiretamente da realização deste objetivo.

**MUITO OBRIGADA!!!**

“Aquele que se ajoelha perante Deus,  
não se curva diante de nenhuma  
dificuldade.”

Bíblia Sagrada

## RESUMO

Objetivou-se avaliar a eficácia da adição de sacarose na solução de vitrificação de embriões ovinos produzidos *in vivo*. Foram selecionadas 40 ovelhas da raça Dorper, as quais foram superovuladas, e após a detecção dos estros sincronizados, foram cobertas no início do estro e 24 horas depois. Imediatamente antes da colheita de embriões, por laparotomia, foi realizada uma laparoscopia para avaliação da resposta superovulatória. O lavado recuperado foi submetido à procura e avaliação de embriões e estes foram divididos em dois protocolos de vitrificação, sendo o Grupo A submetido ao protocolo tradicional e o grupo B submetido a um protocolo de vitrificação com adição de sacarose. Após a descongelação, os embriões foram novamente divididos, sendo aqueles dos grupos A2 e B2 não submetidos e os grupos A1 e B1 submetidos à remoção dos crioprotetores. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão. Foi realizada a ANOVA e os dados, em porcentagem, foram submetidos ao Qui-quadrado com  $P < 0,05$ . Os embriões vitrificados na ausência de sacarose apresentaram maiores proporções de embriões de menor qualidade pós-descongelação (44,5 vs. 22,2%), menores percentuais de embriões com baixo nível de extrusão pré-vitrificação (91,67 vs. 72,22%) e menores percentuais de embriões homogêneos pós-descongelação (38,89 vs. 63,89%), enquanto os demais parâmetros não diferiram entre estes grupos. Quando comparados os embriões submetidos à remoção do crioprotetor ou não, houve um menor percentual de embriões levemente heterogêneos no grupo de embriões não submetidos (13,64 vs. 36,96%), e esse grupo apresentou uma menor taxa de embriões que não ré-expandiram (0,0 vs. 8,69%). Pode-se concluir que a sacarose beneficiou a qualidade embrionária pré e pós-vitrificação.

Palavras-chave: açúcar, blastocisto, mórula, ovelha, criopreservação

## **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the efficacy of adding sucrose in vitrification solution of ovine embryos produced in vivo. We selected 40 Dorper lambs, which were superovulated, the beginnings of synchronized estrus were detected, being covered at the beginning of estrus and 24 hours later. Immediately prior to embryo collection, by laparotomy, a laparoscopy was performed. The recovered lavage underwent assessment of demand and embryos and these were divided into two vitrification protocols, and the "A" group underwent the traditional protocol group and "B" to a vitrification protocol with added sucrose. After thawing, embryos were again divided, with those groups A2 and B2 not subject and groups A1 and B1 subjected to removal of cryoprotectants. Results were expressed as mean  $\pm$  standard error. ANOVA was performed and data, in percentage, were subjected to chi-square test with  $P < 0.05$ . The vitrified embryos in the absence of sucrose had higher proportions of lower-quality embryos after thawing (44.5 vs. 22.2%), lower percentage of embryos with low extrusion pre-vitrification (91.67 vs. 72, 22%) and lowest percentages of post-thaw embryos homogeneous (38.89 vs. 63.89%), while the other parameters did not differ between these groups. When compared embryos underwent removal of cryoprotectant or not, there was a slightly lower percentage of embryos heterogeneous group of embryos not subjected (13.64 vs. 36.96%), and this group had a lower rate of embryos not reverse -expanded (0.0 vs. 8.69%). In conclusion, sucrose improved the embryo quality before and after vitrification.

Keywords: embryo, sheep, sucrose, vitrification

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Embriões produzidos <i>in vivo</i> a partir de ovelhas Dorper e classificados como Homogêneos (A), Levemente heterogêneos (B), ou heterogêneos (C).....	42
Figura 2: Embriões produzidos <i>in vivo</i> a partir de ovelhas Dorper e classificados como baixo nível de extrusão (A), médio (B) ou alto (C).....	42
Figura 3: Ilustração do delineamento experimental mostrando as composições das diferentes soluções de vitrificação e as formas de transferência utilizadas .....	44
Figura 4: Graus de qualidade (Excelente ou Bom, Regular, Pobre e Morto ou Degenerado) de embriões produzidos <i>in vivo</i> a partir de 40 ovelhas Dorper, exploradas na região semiárida do Vale do São Francisco .....	46

## LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Graus de qualidade (Bom, Regular, Pobre e Morto; %), Nível de extrusão (Alta, Média e Baixa), Grau de Homogeneidade da massa embrionária (Homogêneo, Levemente Heterogênea e Heterogênea), Presença ou Ausência de Retração ou Ré-expansão embrionária, antes do processo de vitrificação e após a descongelação de embriões Dorper, produzidos <i>in vivo</i> e vitrificados na ausência de sacarose e submetidos (A1) ou não (A2) à remoção do crioprotetor, bem como na presença de sacarose e submetidos (B1) ou não (B2) à remoção do crioprotetor.....	47
--	----

## LISTA DE ABREVIações

- CEDEP – Comitê de ética e deontologia em estudos e pesquisa
- CIDR – Dispositivo Interno de Liberação Controlada de Progesterona
- CL – Corpo Lúteo
- DMPBS – Solução Tamponada de Dubbeco Modificado Fosfatada
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EBDA – Empresa Baiana de Desenvolvimento Agropecuário
- eCG – *equine chorionic gonadotropin* (Gonadotrofina Coriônica equina)
- FSH – *Follicle stimulating hormone* (Hormônio Folículo Estimulante)
- GnRH – *Gonadotropin-releasing hormone* (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas)
- LH - *Luteinizing hormone* (Hormônio Luteinizante)
- MOTE – Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões
- OPS – *Open Pulled Straw* (Palheta puxada e aberta)
- PGF2 $\alpha$  – Prostaglandina F2 $\alpha$
- PIV – Produzido *in vitro*
- SC – Subcutâneo
- SFB – Soro Fetal Bovino
- SPRD – Sem Padrão de Raça Definido
- TE – Transferência de Embriões
- UI - Unidade Internacional
- UNIVASF – Universidade Federal do Vale do São Francisco

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1. Fisiologia da reprodução de ovelhas .....	18
2.2. Produção <i>in vivo</i> de embriões .....	19
2.2.1. Sincronização do estro .....	19
2.2.2. Superovulação .....	20
2.2.3. Colheita de embriões .....	21
2.2.4. Avaliação de embriões .....	23
2.3. Criopreservação de embriões .....	24
2.3.1. Princípios da criopreservação .....	25
2.3.2. Crioprotetores.....	27
2.3.3. Métodos de criopreservação .....	29
2.3.3.1. Congelação lenta.....	29
2.3.3.2. Vitrificação.....	31
2.3.3.3. Vitrificação com OPS.....	32
2.3.3.4. Vitrificação com nitrogênio super-resfriado .....	34
2.3.4. Estado atual da criopreservação de embriões ovinos .....	34
3. JUSTIFICATIVA .....	36
4. OBJETIVOS .....	38
4.1. Objetivo geral .....	38
4.2. Objetivos específicos.....	38
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
5.1. Ética animal.....	38
5.2. Época e local .....	39
5.3. Animais experimentais .....	40
5.4. Tratamentos hormonais.....	40
5.5. Detecção de estro e fertilização .....	40
5.6. Avaliação da resposta superovulatória .....	40
5.7. Colheita de embriões .....	41
5.8. Avaliação dos embriões recuperados.....	42
5.9. Delineamento experimental e vitrificação .....	43
5.10. Parâmetros avaliados .....	44

5.11. Análise estatística .....	45
RESULTADOS .....	45
7. DISCUSSÃO .....	50
8. CONCLUSÕES .....	53
9. REFERÊNCIAS .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os primeiros estudos, tem-se observado que a eficiência da transferência de embriões criopreservados-descongelados é afetada pela queda na viabilidade celular, após o descongelamento, o que resulta em taxas de gestação mais baixas quando comparadas àquelas obtidas a partir de embriões transferidos a fresco (DOBRINSKY, 1996).

Neste contexto, nas últimas décadas, novos métodos de criopreservação têm ganhado destaque. É o caso da vitrificação de embriões, a qual se mostra uma técnica mais simples, rápida e menos onerosa quando comparada à congelação lenta (BARIL et al., 2001). Entretanto, a necessidade de altas concentrações de crioprotetores pode causar danos às células embrionárias, através do estresse osmótico e toxicidade química (PAPADOPOULOS et al., 2002). Além disso, os crioprotetores diminuem a capacidade do meio de congelação em alcançar o estado vítreo e isto pode aumentar o tempo disponível para peroxidação lipídica dos embriões (RALL, 1987).

Buscando diminuir esses entraves no processo de vitrificação, diversos protocolos já foram desenvolvidos, com o uso de diferentes crioprotetores, como, por exemplo, o Dimetilsulfóxido (HONG et al., 2007), Glicerol e Propilenoglicol (WERLICH et al., 2006), além do Etilenoglicol (GUIGNOT et al., 2006). Songsasen et al. (1995) demonstraram que embriões ovinos de seis dias são mais permeáveis ao Etilenoglicol que ao Glicerol, sendo uma possível explicação para as altas taxas de sobrevivência conseguidas com o Etilenoglicol, quando comparado ao Glicerol. No entanto, as taxas de sobrevivência embrionária ainda são mais baixas, quando comparadas àquelas de embriões transferidos a fresco e altamente variáveis.

Neste contexto, a adição de macromoléculas, como a sacarose, tem sido usada com a função de promover um efeito osmótico significativo, bem como reidratar os embriões após a descongelação (HURT, 1999), o que pode levar a um aumento significativo na sobrevivência embrionária (SAITO et al., 1994). A relevância desses crioprotetores extracelulares é o efeito estabilizador da membrana (CROWE et al., 1983), além de auxiliarem a entrada dos

crioprotetores permeáveis, sendo, portanto, geralmente, utilizados em associações (FRIEDLER et al., 1988; ALLER et al., 1995; MARTINÉZ et al., 2002).

Uma possibilidade para aperfeiçoar o processo de transferência de embriões criopreservados-descongelados é a transferência direta, a qual consiste em inovular os embriões no útero da receptora, sem a necessidade de submetê-los a banhos sucessivos para reidratá-los e retirar o crioprotetor, o que simplifica substancialmente este processo, reduzindo o tempo de manipulação, além de dispensar a necessidade de treinamento de pessoal e equipamentos especializados (ACCORSI, 2008).

Com o desenvolvimento de meios que associam crioprotetores permeáveis e impermeáveis e o, conseqüente, aumento da molaridade e da hidrostática da solução, favorecendo o alcance do seu estado vítreo (RALL, 1987), faz-se necessário verificar a viabilidade embrionária pós-transferência direta de embriões submetidos à criopreservação com o uso desses meios.

A transferência direta de embriões criopreservados-descongelados tem sido realizada com embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. Green et al. (2009), trabalhando com embriões ovinos da raça Ile de France, produzidos *in vivo*, encontraram taxas de gestação superiores com transferência direta, quando comparado à transferência após a retirada dos crioprotetores utilizados no procedimento de vitrificação. Diante dos piores resultados obtidos com embriões produzidos *in vitro* (ALVARENGA et al., 2007; LIM et al., 2008), devido ao maior número de vacúolos (SHAMSUDDIN et al., 1992) e à maior fragilidade da zona pelúcida (DUBY et al., 1997), grande parte dos estudos desenvolvidos é direcionada a eles, tornando-se escassos estudos quanto à produção *in vivo* de embriões ovinos.

Para melhor entendimento sobre os diversos protocolos de criopreservação de embriões e suas aplicações em embriões ovinos, foi realizada uma revisão de literatura abordando os principais pontos deste tema.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Fisiologia da reprodução de ovelhas

As ovelhas são poliéstricas estacionais e fotoperiódicas negativas. Isso significa que a diminuição da quantidade de horas de luz/dia estimula a atividade ovariana e o comportamento sexual, os quais são concentrados numa determinada estação do ano (outono). No entanto, esta variação da luz, em latitudes menores que 25°, é pouco significativa. Dessa forma, a disponibilidade de alimento e o estado nutricional têm maior relevância para animais de regiões tropicais (TERVIT, 1987; SENN & RICHARDSON, 1992).

O ciclo estral das ovelhas dura, em média, 17 dias e é dividido em fases folicular e luteal, sendo a primeira, a fase em que ocorre o recrutamento, crescimento folicular e, ainda, o estro e a ovulação, enquanto a segunda corresponde à fase de desenvolvimento e atividade do corpo lúteo (CL). O estro destes animais dura de 24 a 36 horas e a ovulação ocorre, geralmente, no terço final do estro (GONSALVES et al., 2001).

Este processo é regulado pelo hipotálamo, que é estimulado na estação reprodutiva a secretar o Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH). Este hormônio tem ação estimuladora da hipófise anterior, a qual secreta o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH), os quais, por sua vez, chegam pela via circulatória ao ovário e desempenham, dentre outras funções, o papel de estimular o crescimento folicular e a secreção de estrógeno, que é responsável pelo comportamento estral e promoção da ovulação. No momento da ovulação, a estrutura remanescente do folículo pré-ovulatório sofre alterações estruturais e morfológicas, dando origem ao CL, que inicia a secreção de Progesterona ( $P_4$ ), a qual tem a função de bloquear o ciclo e manter a gestação. Quando completa, em média, 14 dias de vida, e não há gestação, o CL sofre lise e regressão, por ação da Prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ), secretada pelo endométrio na presença de outro hormônio denominado Ocitocina. Com a lise do CL, cessa a liberação de  $P_4$  e há o desbloqueio do ciclo, que reinicia (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

## 2.2. Produção *in vivo* de embriões

A produção *in vivo* de embriões consiste em aumentar o número de embriões produzidos por uma fêmea de alto valor genético e a posterior transferência destes para fêmeas de baixo valor zootécnico, que darão continuidade à gestação e, posteriormente, a amamentação (BARIL et al., 1995).

Essa biotécnica envolve um complexo processo que inicia com a seleção de um grupo de animais geneticamente superiores, para serem submetidos a um protocolo hormonal de sincronização do estro e superovulação, sendo estas chamadas de doadoras. Após cobertura ou inseminação artificial destes animais, é realizada a colheita de embriões, que pode ser por via cirúrgica, semi-cirúrgica ou transcervical. Os embriões recuperados, identificados e avaliados podem ser transferidos a fresco ou passarem por um processo de criopreservação, antes de sua transferência, possibilitando uma maior difusão da técnica e do material genético produzido (BARIL et al., 1995).

Para que esse processo tenha sucesso, todas as etapas devem ser executadas de forma a superar os principais entraves desta técnica, tais como a variabilidade da resposta superovulatória, a perfeita sincronia entre doadoras e receptoras, bem como a eleição de protocolos de criopreservação embrionária que combinem resultados satisfatórios e baixo custo (FREITAS & SIMPÍCIO, 2001).

### 2.2.1. *Sincronização do estro*

A sincronização do estro consiste em agrupar os estros de um grupo de animais, em um pequeno intervalo de tempo. Essa biotécnica é base para diversas outras técnicas, como, por exemplo, a Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE), pois permite que os embriões colhidos das doadoras estejam na mesma fase de desenvolvimento, bem como que doadoras e receptoras estejam com seus ciclos estrais sincronizados, potencializando a sobrevivência embrionária pós-inovulação (BARIL et al.,

1995).

A sincronização dos estros pode ser conseguida através de protocolos hormonais que alongam ou encurtam o ciclo estral. Para o encurtamento do ciclo, geralmente, são utilizadas drogas luteolíticas (HOPPE & STYTER, 1989), ou seja, fármacos que promovem a lise do CL e, dessa forma, provocam o desbloqueio do ciclo. No entanto, esta técnica só pode ser aplicada a animais cíclicos, sendo por isso mais utilizados protocolos que alongam o ciclo estral.

Diversos protocolos têm sido desenvolvidos neste sentido, geralmente, com associações de dispositivos progestágenos, que são inseridos intravaginalmente e liberam P<sub>4</sub>, e hormônios análogos ao FSH e LH, como a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG), administrados, intramuscularmente, em doses que variam de 350 a 500 UI (MARTÍNEZ et al., 2007; URIBE-VELÁSQUEZ et al., 2008). A eCG é utilizada em baixas doses com o objetivo de diminuir o intervalo entre o estro e a ovulação (CLINE et al., 2001).

### 2.2.2. Superovulação e fecundação

A superovulação ou múltipla ovulação consiste em recrutar e promover o crescimento e seleção de um maior número de folículos do que o fisiologicamente normal para destiná-los à ovulação (GONSALVES et al., 2001).

Os protocolos de superovulação em ovinos são geralmente baseados no uso de gonadotrofinas no final do tratamento progestágeno (ISHWAR & MEMON, 1996), sendo as principais utilizadas: a eCG, em doses que variam de 1000 a 2000 UI (COGNIÉ, 1999); ou o FSH, em seis ou oito doses decrescentes, intervaladas por 12 horas, nos três últimos dias de tratamento progestágeno (D'ALESSANDRO et al., 2005; VEIGA-LOPEZ et al., 2005). Estes hormônios agem resgatando folículos do estágio inicial de atresia, através da reativação dos mecanismos normais de desenvolvimento folicular, bem como da promoção de um maior índice de mitose. Além disso, tais hormônios atuam estimulando um conjunto de folículos pequenos, levando-os a um desenvolvimento, num ritmo superior ao normal e, ainda, reduzindo o processo de atresia folicular (FERNANDES, 2003).

A resposta ao protocolo de superovulação pode ser influenciada por

fatores intrínsecos à fêmea, como, por exemplo, o número de folículos responsivos às gonadotrofinas, no início do tratamento (ALVAREZ, 1994) ou, ainda, por fatores extrínsecos, como o tipo e a forma de aplicação das gonadotrofinas.

A eCG possui um menor custo e uma forma mais prática de aplicação. No entanto, este fármaco possui uma longa meia-vida, o que gera a formação de anticorpos anti-eCG, além de heterogeneidade da resposta, maior índice de embriões degenerados e de cistos foliculares (BARIL et al., 1995).

Neste contexto, a droga mais utilizada neste tipo de protocolo é o FSH, o qual tem apresentado taxas de ovulação e fecundação superiores, além de ser, frequentemente, citado em resultados com boa qualidade embrionária (COGNIÉ, 1999; BLANCO et al., 2003).

A fecundação dos oócitos pode ser feita por monta natural ou por inseminação artificial. No entanto, maiores índices de fecundação têm sido demonstrados em trabalhos que não optam por utilizar as duas biotecnologias juntas (FREITAS & SIMPLÍCIO, 2002).

### 2.2.3. Colheita de embriões

A colheita de embriões consiste em submeter o útero ou a tuba uterina a um processo de lavagem, que tem como objetivo recuperar os embriões produzidos, podendo ser realizada pelos métodos cirúrgico ou laparotomia, semi-cirúrgico ou laparoscopia e não-cirúrgico ou transcervical. Dentre estas técnicas, a mais utilizada, ainda é a laparotomia (ISHWAR & MEMON, 1996; FOLCH et al., 2001; NAQVI et al., 2002; SELVARAJU et al., 2003).

O método cirúrgico pode ser aplicado à tuba uterina ou ao útero, a depender da quantidade de dias após a monta em que se procede a colheita. Independente disso, os animais devem ser submetidos a um jejum hídrico e alimentar de 12 e 24 horas, respectivamente, para, em seguida, serem anestesiados e colocados em maca apropriada para o início da cirurgia.

A cirurgia é realizada com a fêmea em decúbito dorsal, com uma inclinação de 30 a 45°, quando cornos uterinos e ovários são exteriorizados

para contagem dos CL, a qual serve como base para o cálculo de recuperação embrionária (BARIL et al., 1995).

A lavagem é realizada com Solução Salina Fosfato-Tamponada Modificada de Dulbecco (DMPBS), a 37°C. Para isso, cria-se uma via de recuperação do líquido na base do corno uterino com um cateter e uma via de inserção de líquido na junção útero-tubárica com outro cateter, que é acoplado a uma seringa, por onde o líquido é inserido. São utilizados 40 mL de DMPBS por corno uterino e o líquido é recuperado em um tubo graduado de 50 mL (BARIL et al., 1995). Os lavados são vertidos em placas de Petri para contagem e avaliação dos embriões em estereomicroscópio, em um aumento de 40 a 100 vezes.

No entanto, este método pode causar traumas cirúrgicos com consequentes formação de aderências pós-operatórias e, por isso, há uma diminuição nas taxas de recuperação quando os animais são submetidos a sucessivas laparotomias. Torres & Sevellec (1987) verificaram uma redução da taxa de recuperação de 88,0% para 24,0%, após três colheitas sucessivas nos mesmos animais da espécie ovina.

Para minimizar os efeitos negativos deste método de colheita de embriões, uma alternativa é a aspensão de soro heparinizado no útero e nos ovários (50 UI de heparina sódica/mL) ou com solução de Dextran 70 g a 6,0%. A sutura, por sua vez, pode ser realizada com um padrão simples interrompido com fio de poliglactina 2-0 (ISHWAR & MEMON, 1996).

Quanto à colheita de embriões por laparoscopia, é realizada em maca de imobilização específica. Em seguida, é estabelecido um pneumoperitônio para início do procedimento de colheita, para o qual são realizadas três punções abdominais, sendo uma para o endoscópio, outra para uma sonda de três vias e uma última para a pinça de manipulação. No entanto, além de também expor o animal a riscos de aderências, essa técnica exige um operador treinado e habilidade com instrumentos de endoscopia (GONSALVES et al., 2001). Na tentativa de diminuir os riscos de aderências e os custos dos equipamentos de endoscopia e da mão-de-obra especializada, além de prolongar a vida reprodutiva das doadoras de embriões, foi desenvolvida a colheita de embriões pela via transcervical.

Nesta técnica, a cérvix é tracionada com o auxílio de pinças de Allys e, com um cateter de três vias, ultrapassa-se a cérvix, chegando ao útero, quando, através de uma das vias, é injetado ar para inflar o balão do cateter de três vias no lúmen de cada corno uterino, obstruindo o mesmo. Então, por outra via, ocorre a injeção de DMPBS, carreando os embriões para a terceira via, a qual desembocará num tubo plástico, recuperando meio DMPBS e, possivelmente, embriões. No entanto, a anatomia da cérvix de ovelhas limita os resultados de taxa de recuperação dessa técnica (OLIVEIRA & GONZALES 1992).

Com o intuito de aumentar a permeabilidade cervical, a administração de prostaglandinas ou destas, associadas ao cipionato de estradiol, horas antes da colheita, têm sido realizadas (BARRY et al., 1990). No entanto, as taxas de recuperação obtidas pelo método cirúrgico ainda são superiores, variando de 70% a 90% (BARIL et al., 1995; FORCADA et al., 2011). Greyling et al. (2002) encontraram, ainda, percentuais de recuperação embrionária variando de 80% a 94%, ao colherem embriões do útero caprino por este método. Já as taxas conseguidas pelo método transcervical giram em torno de 60% em cabras (LIMA-VERDE et al., 2003) e, em ovelhas, os dados quanto à taxa de recuperação embrionária utilizando a via transcervical são escassos e inconsistentes.

#### 2.2.4. Avaliação dos embriões

A avaliação dos embriões é feita de forma individual, sendo observadas várias características como: tamanho, morfologia, cor, homogeneidade da massa celular, integridade da zona pelúcida, presença e tamanho de células no espaço perivitelínico e, ainda, presença de retração e reexpansão embrionária (RUMPF et al., 1997).

A partir dessas observações, os embriões são avaliados, sendo a classificação mais aceita a da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), a qual os denomina de embriões de Graus I, II, III e IV. Considerando os parâmetros descritos, os embriões recebem uma identificação, sendo que, segundo essa classificação, os embriões Grau I são

aqueles que apresentam massa embrionária simétrica e esférica; os blastômeros uniformes em tamanho, cor e densidade; irregularidades devem ser relativamente menores e, ao menos, 85% do material celular deve ser de massa embrionária viável intacta. Embriões de Grau II têm, como características, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais; ao menos 50% do material celular deve compor uma massa embrionária viável, intacta. Já o embrião de Grau III se trata daquele que apresenta irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais; ao menos 25% do material celular deve formar uma massa embrionária viável, intacta. Finalmente, os embriões de Grau IV são os mortos ou degenerados, não apresentando uma forma definida, sendo impossível determinar o estágio de desenvolvimento, devido a desorganização celular (RUMPF et al., 1997).

Os embriões classificados como I, II e III são passíveis de transferência. No entanto, para a micromanipulação e a criopreservação, somente os embriões I e II são utilizáveis (RUMPF et al., 1997).

### 2.3. Criopreservação de embriões

A criopreservação de embriões consiste em manter, através de baixas temperaturas, o metabolismo celular em estado de quiescência, retardando a atividade enzimática e o metabolismo de respiração celular, possibilitando um longo período de estocagem (GORDON, 1994).

Essa tecnologia tem ganho importância nas últimas décadas, por promover a difusão de material genético de alto valor biológico por todo o mundo, com a eliminação do custo com transporte de animais e, conseqüente, redução do risco de transmissão de doenças, visto que somente estruturas congeladas em determinadas condições, podem ser comercializadas (MAPLETOFT & STOOKEY, 1998).

Os principais métodos de criopreservação de embriões são: o método tradicional ou congelação lenta, e a vitrificação, sendo que cada um deles segue um princípio de criopreservação, visando causar menor prejuízo celular.

A susceptibilidade dos embriões aos danos causados pelo processo de criopreservação pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento, espécie e origem do embrião (ALI & SHELTON, 1993; DOBRINSKY, 1996; BARIL et al., 2001). Além disso, o tipo e a concentração dos crioprotetores estão intimamente relacionados à toxicidade e permeabilidade do embrião (ALI & SHELTON, 1993; MCGINNES et al., 1993; SZÉLL & SHELTON, 1996).

### *2.3.1. Princípios da Criopreservação*

O princípio mais importante da criopreservação é a necessidade da menor quantidade de água intracelular antes da criopreservação, com o objetivo de prevenir a formação de cristais de gelo e danos celulares, que podem levar à retomada do metabolismo, mesmo após o armazenamento em baixas temperaturas (VAJTA & KUWAYAMA, 2006). No entanto, a remoção da água de forma demasiada também pode ser prejudicial ao embrião (SEIDEL Jr., 1986).

Os principais prejuízos causados aos embriões neste processo se devem à formação de cristais intracelulares de gelo, ao estresse osmótico e à interação desses dois fatores (PICKETT, 1986).

No processo de congelação, à medida que a temperatura cai, a água tende a cristalizar, elevando a concentração de solutos extracelulares. Portanto, quando a taxa de refrigeração é baixa, a célula sofre desidratação. No entanto, quando a taxa é alta, a célula não perde a quantidade suficiente de água, havendo, nesse caso, uma conseqüente formação de cristais de gelo que causam danos mecânicos e podem levar à morte celular (ENGLAND, 1993; REICHENBACH et al., 2002). Assim, quanto menor a velocidade de congelação, maior a taxa de sobrevivência, até que seja alcançada a relação ideal e, após esse ponto, estas taxas caem, formando uma parábola. Assim, a taxa de refrigeração determina o grau de retração celular e a presença de cristais de gelo (MAZUR, 1984).

A velocidade de congelação pode ser classificada como lenta, moderada, rápida e ultrarrápida (LEIBO, 2008). As taxas de refrigeração consideradas lenta, moderada, rápida e ultrarrápida ficam em torno de -

35°C/min, -80°C/min, -200°C/min e acima de -20.000°C/min, respectivamente, podendo esta última chegar a -100.000°C/min (VAJTA & NAGY, 2006).

O processo em si de congelação inicia quando a água (pura) encontra-se parcialmente congelada a 0°C, sendo este o ponto de equilíbrio de congelação, onde a água e os cristais de gelo coexistem de forma equilibrada e homogênea. Neste ponto, inicia-se a cristalização, processo que libera energia na forma de calor (calor latente de fusão), aumentando a temperatura necessária para que o ponto de equilíbrio de congelação seja atingido e quase toda água líquida seja convertida em gelo. Com a adição de solutos à água, há uma diminuição na temperatura de congelação, o que retarda o aparecimento de cristais e a temperatura de equilíbrio de congelação torna-se inferior a 0°C (KAROW, 2001).

Tendo em vista a complexidade dos materiais biológicos e de seus diversos solutos intra e extracelulares, o ponto de fusão de embriões é menor do que o da água pura e, à medida que a água vai cristalizando, aumenta a concentração de solutos na porção líquida restante, o que altera a osmolaridade intra e extracelular (KAROW, 2001).

Neste contexto, os crioprotetores são adicionados com o objetivo de aumentar a viscosidade da solução, buscando um maior equilíbrio osmótico entre a solução e as células (DALCIN & LUCCHI, 2010), impedindo efeitos nocivos referentes à formação de cristais de gelo e ao estresse osmótico.

Semelhante ao processo de congelação, a descongelação também pode influenciar a sobrevivência embrionária. O sucesso desta etapa é dependente da forma como foi realizada a criopreservação, da re-hidratação celular e remoção do crioprotetor após a descongelação (WOODS et al., 2004).

O processo de descongelação pode levar à formação de grandes cristais de gelo pelo crescimento de pequenos núcleos de cristais, formados na criopreservação, o que resulta em uma recristalização e consequentes danos celulares (BROCKBANK et al., 2001).

No processo de descongelação, também ocorre fluxo de água e de crioprotetor, por via osmótica, através da membrana celular. Este fator é muito importante para a prevenção de danos mecânicos e ruptura de membrana. Neste sentido, a utilização de açúcares é uma alternativa para prevenir a

excessiva turgidez osmótica, durante a remoção do crioprotetor, na descongelação (WOODS et al., 2004). Os açúcares mais utilizados nesta fase são a galactose, trealose e, principalmente, a sacarose (PEREIRA & MARQUES, 2008).

### 2.3.2. Crioprotetores

Independente do método de criopreservação, há a necessidade do uso de solutos chamados de crioprotetores, que consistem em moléculas com função de proteger as células neste processo. Estas substâncias diminuem o ponto de solidificação da solução em até 2 a 3°C, o que é benéfico porque aumenta o tempo de desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo (SEIDEL et al., 1989)

Os crioprotetores podem ser permeáveis ou impermeáveis, sendo os permeáveis, moléculas estruturalmente pequenas, conseguindo, por isso, atravessar a membrana celular. No interior da célula, estas moléculas formam pontes de hidrogênio com moléculas de água e diminuem a temperatura de congelação, prevenindo a formação de cristais de gelo (DALCIN & LUCCI, 2010).

Atualmente, o crioprotetor intracelular mais utilizado é o etilenoglicol, por apresentar resultados superiores, quando comparado aos demais crioprotetores em diversas espécies (McGINNIS et al., 1993; SOMMERSFELD & NIEMANN, 1999; MARTINEZ et al., 2002; GUINOT et al., 2006; GARCIA-GARCIA et al., 2006; MUCCI et al., 2006; BETTENCOURT et al., 2009).

Os crioprotetores intracelulares são importantes componentes da solução de criopreservação, pois a presença desses solutos no interior das células previne a formação de cristais de gelo e a ocorrência de danos osmóticos (KASAI, 2002).

No entanto, a adição desses solutos pode causar uma retração temporária às células, devido à concentração utilizada, que faz a água sair da célula por osmolaridade e, quando a concentração intra e extracelular se equilibram, a célula volta ao tamanho original. Esta retração pode ser diminuída pela adição, de forma gradual, dos crioprotetores permeáveis (SEIDEL, 1996).

Os principais crioprotetores permeáveis são o glicerol, propilenoglicol, etilenoglicol e dimetilssufóxido (DMSO) (VAJTA & NAGY, 2006).

Já os crioprotetores impermeáveis são moléculas grandes, de alto peso molecular, que, por isso, permanecem no meio extracelular, retirando, por efeito osmótico, a água livre e levando a célula à desidratação (VAJTA & NAGY, 2006; PEREIRA & MARQUES, 2008), e desempenham o papel de promover a saída inicial da água intracelular, (FRIDLER et al., 1988; ALLER et al., 1995). Estas moléculas são utilizadas, normalmente, em associação com crioprotetores permeáveis, para que estes possam penetrar em maior quantidade nas células, prevenindo a formação de cristais de gelo e diminuindo a toxicidade pela diminuição da concentração necessária (PEREIRA & MARQUES, 2008).

Além disso, estas moléculas podem ser utilizadas no processo de descongelação, interagindo com as membranas celulares e exercendo ação estabilizadora, no momento da passagem do estado sólido para o líquido, evitando a ruptura das mesmas (SEIDEL, 1986).

Os principais crioprotetores extracelulares incluem, geralmente, açúcares, como: galactose, glicose, trealose, manitol, sorbitol e sacarose (CROWE et al., 1983). A adição de crioprotetores como sacarose, trealose e dextrose aumentam a sobrevivência de embriões vitrificados (SAITO et al., 1994).

O crioprotetor extracelular mais utilizado é a sacarose, por exercer um efeito osmótico significativo e, por isso, tem sido utilizado tanto no processo de congelação quanto no de descongelação de embriões (HURT, 1999).

As duas categorias de crioprotetores podem ser utilizadas associadas ou separadas em diversos protocolos de criopreservação (IM et al., 1997; YOUNG et al., 1998). De forma geral, os crioprotetores são diluídos em solução salina tamponada (PBS) ou, em menor frequência, em meios mais ricos, como, por exemplo, o TCM-199 (HAMANO et al., 1992; PAPIS et al., 1999) ou o H\_CZBB (MARTINO et al., 1996).

Os crioprotetores presentes na solução de congelação e de vitrificação reduzem a ocorrência de descongelação e desvitrificação, respectivamente, porém a capacidade de indução do estado vítreo de cada crioprotetor varia de

acordo com suas características químicas. Como exemplo, temos o etilenoglicol, que, por apresentar uma fraca indução de vitrificação, deve ser utilizado em altas concentrações, o que aumenta o risco de toxicidade (BAUDOT et al., 2000). Para minimizar este efeito, este crioprotetor deve ser associado a outros que apresentem forte indução, como, por exemplo, o DMSO (BAUDOT et al., 2000) ou a açúcares que aumentam a molaridade da solução, favorecendo o alcance do estado vítreo (RALL, 1987). Além disso, pode-se associar o etilenoglicol a aditivos bloqueadores da nucleação do gelo, como, por exemplo, proteínas anticoagulantes (ARAV et al., 1994) e polímeros sintéticos, como o álcool polivinílico (WOWK et al., 2000), aumentando, dessa forma, a capacidade de indução com redução da toxicidade.

A adição de crioprotetores, principalmente em soluções de vitrificação, as quais exigem altas concentrações destes, deve ser realizada de forma gradual para evitar um choque osmótico (ABE et al., 2005), de forma que permita a adaptação osmótica e saturação mais homogênea do crioprotetor, dentro da célula (PAPIS et al., 2000).

### *2.3.3. Métodos de criopreservação*

Os principais métodos de criopreservação, conhecidos como congelação lenta, vitrificação, OPS e o Nitrogênio super-resfriado, diferem grandemente quanto aos seus princípios e ferramentas. A congelação lenta consiste em um balanço osmótico em uma máquina de congelação programada, enquanto a vitrificação consiste em uma brusca substituição da água intracelular pelo crioprotetor, de forma a alcançar, rapidamente, o estado vítreo, prevenindo a formação de cristais de gelo (DALCIN & LUCCI, 2010).

#### *2.3.3.1. Congelação lenta*

Neste método de criopreservação, são utilizadas baixas concentrações de crioprotetores e a curva de congelação é controlada por um congelador programável (VAJTA & NAGY, 2006).

Desde quando foi desenvolvida em 1972 por Whittingham, a congelação

lenta vem sendo amplamente utilizada comercial e industrialmente. Esse método baseia-se na tentativa de criar um balanço entre os fatores que determinam a formação de cristais de gelo, fraturas, estresse osmótico e a toxicidade do meio, de forma que o meio intra e extracelular troquem solutos sem causar deformidades celulares (VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

O método exige um pré-equilíbrio dos embriões em solução crioprotetora e, em seguida, uma queda de temperatura, regulada por uma máquina específica. Na primeira etapa, a temperatura cai até  $-7^{\circ}\text{C}$ , quando ocorre a liberação de calor latente de fusão, levando, por isso, a um prejudicial aumento de temperatura. Para evitar este fenômeno, é realizado o *seeding*, que é um breve contato da palheta com um metal pré-refrigerado em nitrogênio líquido.

Após esse período de equilíbrio, que leva de 10 a 15 minutos, os embriões são submetidos a uma queda de temperatura a uma velocidade de 0,3 a  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , até atingir  $-30$  a  $-35^{\circ}\text{C}$ . Neste ponto, há formação de gelo extracelular e, conseqüente, aumento na concentração deste meio, o que provoca a desidratação da célula até o ponto em que a alta concentração de soluto intracelular impeça a cristalização do gelo e ocorra imersão da célula em nitrogênio líquido (VAJTA & NAGY, 2006).

Quanto à descongelação de embriões congelados lentamente, faz-se necessário que o aquecimento seja rápido, impedindo que pequenos cristais cresçam e tornem-se prejudiciais (WOODS et al., 2004).

Após a descongelação, os embriões são submetidos a banhos em soluções com concentrações decrescentes de crioprotetores permeáveis, para a remoção dos mesmos (WOODS et al., 2004) e, em seguida, re-hidratados em meio de manutenção (RALL, 1992).

Diante dos aspectos abordados acima, apesar de estar inteiramente padronizado comercialmente, o processo de congelação lenta de embriões é longo e requer equipamentos específicos e um grande volume de nitrogênio líquido, possuindo, ainda, limitações quanto à prevenção da formação de cristais de gelo intracelular.

### 2.3.3.2. Vitrificação

Este método baseia-se na utilização de altas concentrações de crioprotetores, e uma brusca mudança de temperatura causada pela imersão direta em nitrogênio líquido, o que torna a técnica mais prática e menos onerosa (ALI & SHELTON, 1993).

A principal vantagem da vitrificação é que a formação de cristais de gelo é totalmente eliminada, pois a solidificação é atingida pelo aumento extremamente rápido da viscosidade e não pela cristalização, chegando de forma direta ao estado vítreo (MASSIP, 2001; YAVIN & ARAV, 2007), passando de forma rápida pela fase crítica de temperatura, evitando, assim, as injúrias causadas pela formação de cristais de gelo. No entanto, a principal desvantagem encontra-se na necessidade de altas concentrações de crioprotetores, podendo chegar até 40% e, dessa forma, trazer prejuízos causados pelo choque osmótico e pela toxicidade celular (MASSIP, 2001; VAJTA & NAGY, 2006).

Dessa forma, resume-se a vitrificação como uma técnica que requer um sistema seguro de refrigeração com minimização dos prejuízos causados pelos crioprotetores, embora KUWAYAMA (2007) tenha mostrado que os danos causados pela toxicidade e osmolaridade na vitrificação não são mais prejudiciais que aqueles causados pela congelação lenta.

No processo de reaquecimento, pode ocorrer a desvitrificação, isto é, a formação de cristais de gelo intracelular, quando a concentração do crioprotetor permeável é insuficiente, ou seja, menor que 20%. No entanto, a elevação dessa concentração em excesso pode aumentar os danos decorrentes do efeito tóxico da solução (JIN et al., 2008).

Juntamente com a vitrificação, a possibilidade de transferir embriões vitrificados diretamente após a descongelação tem sido testada em ovelhas, em comparação com a técnica padrão de transferência (COGNIÈ et al., 2003). Nesta técnica, os embriões não passam por qualquer protocolo de remoção de crioprotetores, nem avaliação após a descongelação, dispensando o uso de equipamentos específicos e operador qualificado (COGNIÈ et al., 2003). Utilizando a técnica de transferência de embriões (TE) com remoção de

crioprotetor, aproximadamente, 16% dos embriões descongelados são eliminados, após a avaliação morfológica (BARIL et al., 2001). Comparando as técnicas de TE sem (TE Direta) e com (TE Indireta) remoção de crioprotetor, os resultados em termos de gestação (67% e 75%, respectivamente) e de taxa de sobrevivência embrionária (53% e 49%, respectivamente) são similares na espécie ovina (BARIL et al., 2001). A avaliação morfológica de embriões congelados-descongelados dificulta a comercialização de embriões por necessitar de um técnico experiente e qualificado, enquanto que a transferência direta representa um ganho potencial de 7-8% em termos de cordeiros nascidos (COCERO et al., 1996).

A transferência de embriões vitrificados-descongelados, de forma direta, foi viabilizada por meio de sua deposição em palhetas de 0,25 mL, contendo solução de sacarose (BARIL et al., 2001; ISACHENKO et al., 2003).

Além do tipo de transferência, o sucesso da vitrificação está ligado à viscosidade da amostra, à taxa de refrigeração-aquecimento, ao volume da amostra, de forma que, quanto maior a viscosidade e a taxa de refrigeração, maior será a chance de vitrificação, devendo, porém, o volume ser menor (YAVIN & ARAV, 2007). Na tentativa de diminuir o volume da amostra, foram desenvolvidas técnicas como a OPS (Open Pulled Straw), na qual a palheta OPS possui metade do diâmetro em sua porção final, sendo possível a redução do volume e o envase, por capilaridade, dos embriões (VAJTA et al., 1998; VAJTA & NAGY, 2006). Foi desenvolvida, ainda, a micropipeta de vidro, porém esta possui uma maior fragilidade quando comparada à palheta plástica OPS (KONG et al., 2000).

#### 2.3.3.3. Vitrificação com Open Pulled Straw (OPS)

A técnica de vitrificação tem sido aprimorada desde o seu desenvolvimento com o uso de diversas associações de crioprotetores e tempos de exposição, bem como de formas de armazenamento e, ainda, de diferentes velocidades de resfriamento.

Dentre os avanços no processo de vitrificação, podemos citar a vitrificação com o uso da palheta OPS. Nessa técnica, a palheta de

inseminação artificial, de 0,25 mL, tem o algodão removido e a região central recebe calor até que esteja amolecida, momento este que a mesma é esticada manualmente, reduzindo o diâmetro interno pela metade. Em seguida, as palhetas esticadas são novamente resfriadas e cortadas ao meio (VAJTA et al., 1997).

Neste método, a taxa de resfriamento é de 2000°C/min devido ao menor volume de solução, ao contato direto entre solução e nitrogênio líquido, bem como à diminuição da espessura da parede da palheta (KULESHOVA & LOPATA, 2002).

Essa alta taxa de refrigeração resultou em menores danos celulares. Além disso, a alta velocidade de mudança de temperatura permite a redução da concentração de crioprotetores, minimizando injúrias tóxicas e osmóticas. Outra vantagem desta técnica é que o armazenamento é simples e fácil, dispensando, ainda o uso de equipamentos caros. Neste método, o envase é realizado por capilaridade com 1 a 2 µL de meio de vitrificação contendo os embriões e, então, a palheta OPS é mergulhada imediatamente em nitrogênio líquido. Isto diminui a ocorrência da frequente dispersão de líquido nas palhetas de tamanho original (VAJTA et al., 1998).

O aquecimento também é realizado por capilaridade, colocando-se a ponta aberta diretamente na placa com meio a 37°C. O meio volta ao estado líquido em 1 a 2 segundos e, em seguida, o embrião flutua no meio de aquecimento (VAJTA et al., 1998).

Como principais entraves da OPS, pode-se citar o risco de transmissão de doenças, resultante do contato direto com o nitrogênio líquido, além das baixas taxas alcançadas quando realizada a transferência direta.

Com o objetivo de sanar esses entraves, foram desenvolvidas técnicas como o acondicionamento das OPS em palhetas de 0,5 mL lacradas (KUWAYAMA, 2007) ou o uso de nitrogênio líquido esterilizado e filtrado em filtros de 0,2 µL (KULESHOVA & LOPATA, 2002), o que pode apresentar uma grande dificuldade operacional (VAJTA et al., 1998).

Nesse contexto, buscando-se alcançar uma alta taxa de refrigeração sem a utilização da OPS, cita-se o nitrogênio super-resfriado, que tem como principal característica a diminuição do ponto de ebulição do nitrogênio utilizado

(VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

#### 2.3.3.4. Vitrificação com nitrogênio líquido super-resfriado

A utilização de vácuo, em máquina específica com nitrogênio líquido, diminui o ponto de ebulição do nitrogênio líquido de  $-196^{\circ}\text{C}$  para  $-200^{\circ}\text{C}$ , aumentando a eficiência da vitrificação (VAJTA & KUWAYAMA, 2006). Isso deve-se ao fato de que, em condições normais de pressão, há a formação de uma bolsa de vapor de nitrogênio formado pelo contato das amostras com o gás liquefeito, que pode diminuir a refrigeração do espécime (YAVIN & ARAV, 2007). Este procedimento elimina esses vapores de nitrogênio, o que resulta em uma maior eficiência na transferência de temperatura entre a amostra e o nitrogênio líquido (VIEIRA et al., 2008), reduzindo, assim, as chances de ocorrência de desvitrificação e recristalização durante o aquecimento (ARAV et al., 2000).

Esse processo exige a utilização de um aparelho como o Vitmaster®, que, através da redução da pressão do recipiente de nitrogênio líquido, provoca uma redução do ponto de fusão do nitrogênio para  $-210^{\circ}\text{C}$ , evitando a ebulição do mesmo e impedindo a formação de gás ao redor da amostra. No entanto, o custo desse equipamento ainda é um entrave ao uso desta técnica (ARAV et al., 2000).

#### 2.3.4. Estado atual da criopreservação de embriões ovinos

A criopreservação de embriões ovinos tem sido realizada tanto pela congelação lenta como pela vitrificação. No entanto, atualmente, o processo de criopreservação, em ovinos, é feito em menor escala do que na espécie bovina devido à relação entre o custo da técnica e o valor do animal (ISACHENKO et al., 2003; BARIL et al., 2001).

As maiores taxas de sobrevivência de embriões ovinos criopreservados têm sido alcançadas quando da utilização de embriões produzidos *in vivo*, com o crioprotetor etilenoglicol e estádios embrionários mais avançados de desenvolvimento, como, por exemplo, o fato de blastocistos apresentarem

melhores taxas de sobrevivência do que mórulas, as quais, por sua vez, apresentam melhores resultados, quando comparadas a embriões de até 16 células (COCERO et al., 1996; GARCIA-GARCIA et al., 2005). Garcia-Garcia et al. (2006) congelaram embriões em diferentes estádios embrionários, desde 2 células até mórula, em etilenoglicol, encontrando taxas de sobrevivência, *in vitro*, de 23,1% enquanto que blastocistos congelados-descongelados resultaram numa sobrevivência de 83,7%, não sofrendo, portanto com o processo de criopreservação, já que apresentaram o mesmo grau de sobrevivência de blastocistos trabalhados a fresco (92,5%;  $P > 0,05$ ).

A vitrificação de embriões ovinos produzidos *in vitro* (embriões PIV), em etilenoglicol e glicerol, resultou em taxas de sobrevivência embrionária de 70 e 50%, respectivamente, sendo consideradas satisfatórias (DATTENA et al., 2000; MARTINEZ et al., 2006). Ainda foi testada nessa espécie, a associação destes dois crioprotetores comparada à utilização do etilenoglicol associado ao DMSO e sacarose, não havendo diferença entre os grupos, tanto produzidos *in vivo* quanto *in vitro* (DATTENA et al., 2004).

Resumidamente, em ovinos, a eficiência da vitrificação tem alcançado taxas de sobrevivência semelhantes às de transferência a fresco (BARIL et al., 2001) e às de congelação lenta, sendo, geralmente, utilizadas mórulas e blastocistos e o etilenoglicol como crioprotetor (DATTENA et al., 2000, 2004; GARCIA-GARCIA et al., 2006; GREEN et al., 2009).

Além disso, têm sido alcançadas taxas semelhantes de sobrevivência embrionária, quando embriões ovinos vitrificados-descongelados são transferidos com remoção do crioprotetor (67%) ou por transferência direta (75%) (BARIL et al., 2001).

### 3. JUSTIFICATIVA

A criopreservação de embriões possibilita a comercialização de embriões de alto valor genético por todo o mundo, evitando os custos com transporte de animais e evitando os riscos de transmissão de doenças entre os países. Além disso, o processo a que o embrião é submetido elimina os patógenos que poderiam ser transmitidos às receptoras de embriões.

Existem vários métodos de criopreservação, como, por exemplo, a congelação lenta, a vitrificação, a OPS e, ainda, o Nitrogênio super-resfriado. Dentro de cada método, são empregados princípios que visam evitar a formação de cristais de gelo, que causam danos às células embrionárias.

Independente do método de criopreservação escolhido, faz-se necessária a adição de crioprotetores. Dentre estes, os extracelulares são responsáveis pela estabilização da membrana celular, evitando o rompimento desta, sendo estes muito utilizados em associação com os crioprotetores intracelulares. Dentre os crioprotetores extracelulares, a sacarose tem sido a mais utilizada em diversas espécies e em diversos protocolos de criopreservação.

A congelação lenta apresenta o entrave da necessidade de equipamentos caros e sofisticados, além de um maior risco à formação de cristais de gelo. Neste contexto, a vitrificação tem sido alvo de diversas pesquisas visando à melhoria das taxas de sobrevivência embrionária.

Dentre esses estudos, em bovinos, tem sido testada a possibilidade de transferência direta de embriões, ou seja, sem a remoção do crioprotetor pós-descongelamento. Essa técnica dispensa a necessidade de um operador qualificado e experiente, bem como de equipamentos caros, além disso, nela é desnecessária a manipulação excessiva dos embriões através da adição da sacarose como crioprotetor, no processo de vitrificação.

Diversos protocolos de vitrificação têm sido aplicados em embriões de várias espécies animais, porém, em diversas raças ovinas, como, por exemplo, a Dorper, os dados são escassos, apesar de se tratar de uma raça extremamente comercial e que imprime uma significativa melhoria no rebanho, sendo atualmente utilizada em muitos programas de melhoramento genético na

região Nordeste do Brasil.

Além disso, grande parte dos estudos de criopreservação de embriões são direcionados para aqueles produzidos *in vitro*, por se tratarem de embriões, morfológicamente, mais frágeis, quando comparados àqueles produzidos *in vivo*.

Dessa forma, faz-se necessário elucidar qual o efeito da adição de sacarose na solução de vitrificação de embriões ovinos da raça Dorper produzidos *in vivo*, bem como verificar os parâmetros *in vitro* de embriões submetidos ou não a remoção do crioprotetor após este protocolo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia da adição de sacarose nas soluções de vitrificação e descongelamento de embriões ovinos Dorper, produzidos *in vivo*, sobre parâmetros *in vitro* de embriões submetidos ou não a remoção do crioprotetor no momento pós-descongelamento.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Verificar a viabilidade pós-descongelamento de embriões ovinos Dorper, vitrificados na presença ou ausência da sacarose;
- Verificar qualidade embrionária, grau de extrusão, grau de homogeneidade, e percentuais de retração e ré-expansão embrionária nos momentos pré-vitrificação e pós-descongelamento de embriões vitrificados na presença ou ausência de sacarose e submetidos ou não a remoção do crioprotetor.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Ética animal

O presente projeto está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sob o Protocolo nº 27051112.

### 5.2. Época e local

Este estudo foi realizado em junho e julho de 2012, durante o fim da estação de cobertura. O experimento foi realizado na Estação Experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola - EBDA, em Jaguarari, Bahia, localizada a 9° 51' 50" S de latitude e 39° 56' 50" O e a uma altitude de 662 m.

A região apresenta precipitação anual de 400 mm, com chuvas ocorrendo principalmente entre os meses de Novembro a Abril. A temperatura média anual é de 23 °C (com máxima e mínima de 18°C e 30°C, respectivamente) e a humidade é de 67,06% (com máxima e mínima de 93,22% e 40,91%, respectivamente) (EMBRAPA, 1993).

### 5.3. Animais experimentais

Foram utilizadas, como doadoras de embriões, 40 fêmeas ovinas da raça Dorper, selecionadas após ultrassonografia, evitando assim, que algum animal prenhe, bem como portador de alguma patologia genital, participasse do trabalho. As doadoras tinham (média  $\pm$  erro padrão) 47,9  $\pm$  8,5 Kg e escore de condição corporal de (média  $\pm$  erro padrão) 2,8  $\pm$  0,2, dentro de uma escala variando de 1 (extremamente magro) a 5 (obeso) (MORAND-FEHR & HERVIEU, 1999). Como receptoras de embriões, foram selecionadas 90 ovelhas Sem Padrão Racial Definido (SPRD), de médio a grande porte, boa aptidão materna, vazias e livres de qualquer doença do trato genital ou aparelho mamário, possuindo (média  $\pm$  erro padrão) 3,1  $\pm$  1,3 anos de idade e escore de condição corporal de (média  $\pm$  erro padrão) 3,1  $\pm$  0,7. Como reprodutores, foram utilizados dois carneiros Dorper de fertilidade comprovada por exame andrológico prévio.

Todos os animais foram submetidos a um regime semi-intensivo de produção, no qual passavam parte do dia em pasto de Caatinga preservada e, no final da tarde, recebiam, em instalações cobertas, feno de capim Tifton (*Cynodon spp.*), à vontade, além de ração concentrada, contendo farelo de milho e caroço de algodão, em quantidades de acordo com o peso médio de cada categoria, atendendo a necessidade de animais em estação reprodutiva (NRC, 1985). Os animais tiveram, ainda, livre acesso à água limpa e sal mineral. A sanidade destes animais foi mantida através de vacinação anual (contra Raiva), vermifugação, quatro vezes ao ano, casqueamento periódico para evitar Pododermatite e descarte orientado quanto à Linfadenite Caseosa.

#### 5.4. Tratamentos hormonais

Inicialmente, as ovelhas foram submetidas a um tratamento de sincronização do estro de 12 dias de impregnação progesterônica, em que, no Dia Zero, foram inseridos dispositivos intravaginais impregnados com 330 mg de progesterona (CIDR-G<sup>®</sup>, Pharmacia, Brasil). A partir do dia 10 do tratamento progesterônico, iniciou-se o tratamento superovulatório com a administração de seis doses decrescentes de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V<sup>®</sup>, Vetrepharm, Canada), nos dias 10, 11 e 12, administradas, intramuscularmente, a cada 12 horas, totalizando doses que variaram de 128 a 200 mg, de acordo com o peso corporal das ovelhas.

#### 5.5. Detecção de estro e fecundação

O início do estro das ovelhas foi detectado utilizando, para isso, dois carneiros Dorper, de fertilidade comprovada, a partir de 12 horas após a remoção dos dispositivos intravaginais e, então, a cada quatro horas, por 72 horas após a retirada do dispositivo. As ovelhas foram cobertas no início do estro e 24 horas depois.

#### 5.6. Avaliação da resposta superovulatória

Antes de serem submetidas à colheita de embriões, as doadoras foram submetidas a um jejum hídrico e alimentar de 12 e 24 horas, respectivamente, no quinto dia após a primeira monta. E, seis dias após a primeira monta e imediatamente antes da colheita de embriões, as ovelhas foram submetidas a uma Laparoscopia para visualizar a resposta ovulatória, conforme descrito por Oldham e Lindsay (1980), respeitando a ordem de aparecimento de estro. Para tanto, no local das punções destinadas à Laparoscopia, as fêmeas receberam anestesia (SC) a base de Cloridrato de Lidocaína a 2% (Anestésico Bravet<sup>®</sup> BRAVET, Brasil). Realizada a observação dos ovários, as ovelhas foram consideradas responsivas ao tratamento superovulatório, quando

apresentaram, contabilizando o somatório de ambos os ovários, cinco ou mais corpos lúteos (CL) (BARIL et al., 1995).

### 5.7. Colheita de embriões

Obtida a resposta ovulatória, foi iniciado o procedimento de colheita de embriões, no sexto dia após a primeira cobertura, o qual foi realizado pelo método de Laparotomia, com o uso do catéter de Foley. Momentos antes da colheita, as doadoras de embriões foram tricotomizadas na região abdominal e anterior ao úbere, onde foi borrifada uma solução iodada (2%) e álcool a 70%. Em seguida, foi aplicado um protocolo anestésico constituído de Sulfato de Atropina a 1% (Sultropin<sup>®</sup>, Sorologic Laboratory, Portugal), como pré-anestésico, na dose de 0,044 mg/kg, aplicado por via intramuscular, seguida pela aplicação de Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser<sup>®</sup>, Laboratórios Calier S/A, Espanha), na dose de 0,22 a 0,30 mg/kg e, após 10 minutos, foi realizada a aplicação de Cloridrato de Lidocaína a 2% (Anestésico Bravet<sup>®</sup>, BRAVET, Brasil), por via epidural alta, na dose de 4,4 a 10 mg/kg (BARIL et al., 1995).

Em seguida, foi aplicado 6-8 mL de Cloridrato de Lidocaína a 2% (Anestésico Bravet<sup>®</sup> BRAVET, Brasil) na linha de incisão, que foi feita na linha Alba e mediu de 7 a 15 cm. O trato reprodutivo foi, então, exteriorizado e, utilizando uma sonda de Foley n° 10 (Solidor<sup>®</sup>, LAMEDID, Brasil), foi feita uma via de recuperação de líquido, próximo à junção intercornual, na base de cada corno uterino, bem como outra, agora de injeção de líquido, com um cateter gelco 18G (Catéter intravenoso<sup>®</sup>, MEDCARE PVT, Índia), na junção útero-tubárica, também de cada corno uterino. Com isso, foi realizada a injeção de 40 mL de PBS (DMPBS<sup>®</sup>, VITROCELL, Brasil), em cada corno uterino, e o líquido foi recuperado pela sonda de Foley, em um tubo graduado de 50 mL (Tubo de centrifugação<sup>®</sup>, TPP, Suíça), possivelmente, contendo os embriões.

Ao término da lavagem, foi aspergido soro fisiológico heparinizado (50 UI de heparina sódica/mL) sobre o trato reprodutivo, com o intuito de evitar a formação de aderências pós-operatórias. A sutura das diversas camadas foi efetuada, seguindo um protocolo padrão simples em três planos.

### 5.8. Avaliação dos embriões recuperados

O lavado recuperado foi vertido em placas plásticas de Petri (Placa de Petri 100<sup>®</sup>, Nutricell, Brasil) e submetido à procura e identificação das estruturas em estereomicroscópio (SMZ 645<sup>®</sup>, Nikon, Japão), utilizando um aumento de 40 a 70X, bem como à avaliação dos embriões, quanto ao seu estágio de desenvolvimento e qualidade, seguindo os critérios morfológicos da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (ROBERTSON & NELSON, 1999), como embriões de graus I (excelente ou bom), II (regular), III (pobre) e IV (morto ou degenerado).

Além disso, foi avaliada homogeneidade da massa, sendo classificados em embriões homogêneos, levemente heterogêneos ou heterogêneos (Figura 1); nível de extrusão, sendo considerado baixo quando o percentual de extrusão foi de 0 a 5%, médio quando o percentual de extrusão foi entre 6 a 15% e alto quando o nível de extrusão ultrapassou os 15% (Figura 2); presença ou ausência de retração da massa embrionária e finalmente, presença ou ausência de reexpansão da massa embrionária imediatamente antes da imersão dos embriões em nitrogênio líquido (pré-vitrificação) e após a remoção ou não do crioprotetor no momento da descongelação.

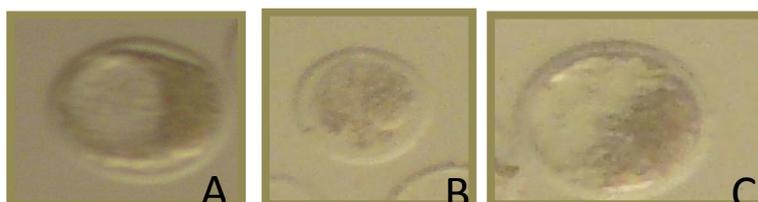


Figura 1: Embriões produzidos *in vivo* a partir de ovelhas Dorper e classificados como Homogêneos (A), Levemente heterogêneos (B), ou heterogêneos (C).

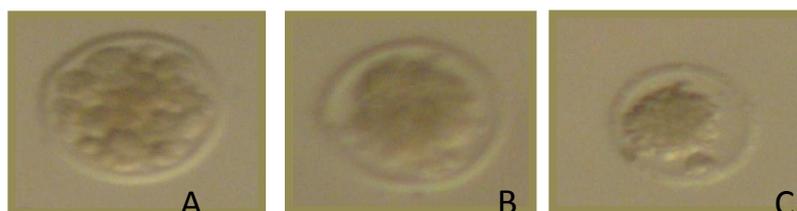


Figura 2: Embriões produzidos *in vivo* a partir de ovelhas Dorper e classificados como baixo nível de extrusão (A), médio (B) ou alto (C).

### 5.9. Delineamento experimental e vitrificação

Os meios utilizados nos protocolos de vitrificação, descritos a seguir, foram obtidos da Empresa Nutricell Nutrientes Celulares Ltda., Brasil.

Os embriões recuperados e avaliados foram divididos em dois grupos equitativos, quanto ao estágio e à qualidade embrionária e, então, foram submetidos a dois diferentes protocolos de vitrificação. No primeiro (Grupo A), os embriões foram imersos em três soluções (DMPBS + 20% SFB; DMPBS + 20% SFB + 10% glicerol; DMPBS + 20% SFB + 10% glicerol + 20% etilenoglicol), a cada 5 minutos, e, em seguida, por 30 segundos, em uma solução de vitrificação com DMPBS + 20% SFB + 25% glicerol + 25% etilenoglicol; no segundo grupo (Grupo B), os embriões foram inclusos nas mesmas soluções que aqueles do Grupo Controle, porém a solução de vitrificação recebeu a inclusão de 0,4 M de sacarose (WERLICH et al., 2006). Imediatamente após esta última etapa, dois ou três embriões foram envasados por palheta plástica e estéril de 0,25 mL (Palheta 0,25<sup>®</sup>, Nutricell, Brasil), com 20 a 30 µL de solução de vitrificação, disposta no centro da palheta, estando separada, lateralmente, por duas bolhas de ar, bem como, também lateralmente, por duas porções de 90 µL, cada, da mesma solução de vitrificação (Figura 1). Em seguida, as palhetas foram lacradas, identificadas e mergulhadas imediatamente em nitrogênio líquido (GUIGNOT et al., 2006).

Para descongelação, as palhetas foram mantidas em contato com o ar, por 10 s e, então, mergulhadas em banho-maria, a 37° C, por 20 s. Em seguida, os embriões foram novamente subdivididos em dois grupos, de acordo com a retirada ou não do crioprotetor, antes da transferência de embriões. Os embriões destinados à retirada do crioprotetor compuseram os grupos A1 e B1 sendo que, no primeiro, os embriões foram oriundos do Grupo A de vitrificação, já descrito anteriormente, enquanto no segundo, os embriões foram oriundos do B. Para tanto, nos grupos A1 e B1, os embriões foram imersos em soluções de 0,25 M e 0,125 M de sacarose, a cada 5 minutos, com o objetivo de remover o crioprotetor. Em seguida, os embriões foram mantidos em DMPBS, por 5 minutos e então foram avaliados quanto a qualidade embrionária. Já os embriões destinados a não remoção do crioprotetor

compuseram os grupos A2 e B2 sendo que, no primeiro, os embriões foram oriundos do protocolo tradicional de vitrificação, já descrito anteriormente, enquanto no segundo, os embriões foram oriundos no protocolo com adição de sacarose. Para tanto, nos grupos A2 e B2, os embriões, após a descongelação, foram imersos em DMPBS, apenas enquanto eram avaliados (Figura 3).

As doadoras de embriões de cada grupo eram semelhantes ( $P=0,6$ ) quanto ao peso sendo as médias dos grupos 1,2, 3 e 4 de 48,81; 50,66; 48,36 e 48,47, respectivamente; quanto à idade ( $P=128$ ) sendo as média dos grupos 3,63; 3,41; 3,37 e 3,12, respectivamente; e também quanto ao escore ( $P=0,36$ ), sendo as médias dos grupos 2,96; 3,05; 2,84 e 3,01, respectivamente.

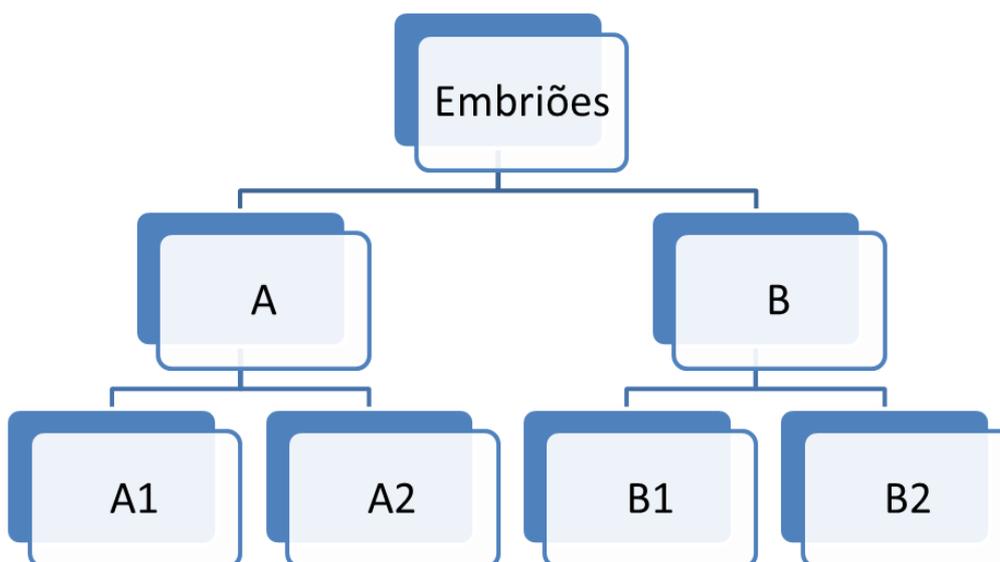


Figura 3: Ilustração do Delineamento experimental, mostrando a divisão dos grupos no momento pré-vitrificação (A e B) e no momento pós-descongelação

#### 5.10. Parâmetros avaliados

Os parâmetros avaliados foram: proporção de fêmeas em estro; ocorrência e momento do início do estro, definido como o intervalo de tempo entre a retirada do CIDR e o início do estro; número médio de corpos lúteos, definido como o número de corpos lúteos (CL) somados nos dois ovários;

números de embriões congeláveis (EMBC: Graus I e II); Estádio de desenvolvimento embrionário; proporção de embriões, em cada grau de qualidade, antes da vitrificação e após a descongelação; proporção de cada nível de extrusão embrionária (Baixa, Média e Alta) antes da vitrificação e depois da descongelação, proporção de cada nível de homogeneidade da massa embrionária (Homogênea, Levemente Heterogênea e Heterogênea) antes da vitrificação e após a descongelação; percentual de embriões retraídos, antes da vitrificação; percentual de embriões re-expandidos, após a descongelação.

#### 5.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. Para comparação dos diversos parâmetros, entre os grupos estudados, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) *one-way*, seguida da realização do teste post-hoc apropriado. Os dados expressos em porcentagem foram submetidos ao Teste do Qui-quadrado. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentaram nível de significância (P) menor que 0,05. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software SPSS.

## 6. RESULTADOS

Foi observado que o protocolo de sincronização do estro e da ovulação utilizado nas doadoras foi efetivo, visto que todas as doadoras de embriões apresentaram estro, sendo o intervalo de tempo médio ( $\pm$  erro padrão) entre a retirada do CIDR e o início do estro de  $16,6 \pm 2,84$  h.

Quanto à resposta ovariana pode-se observar que o tratamento superovulatório foi eficiente, visto que 95% das ovelhas superovularam, apresentando (média  $\pm$  desvio padrão)  $13,85 \pm 6,14$  corpos lúteos.

Com relação à qualidade ou viabilidade embrionária, observou-se que o houve um beneficiamento do tratamento hormonal, pois prevalêncaram embriões congeláveis ( $P < 0,001$ ), ou seja, aqueles qualificados como

Excelentes/Bons e Regulares (72,93%), quando comparados aos embriões não congeláveis, ou seja, Pobres e Mortos/Degenerados (27,07%) (Figura 4).

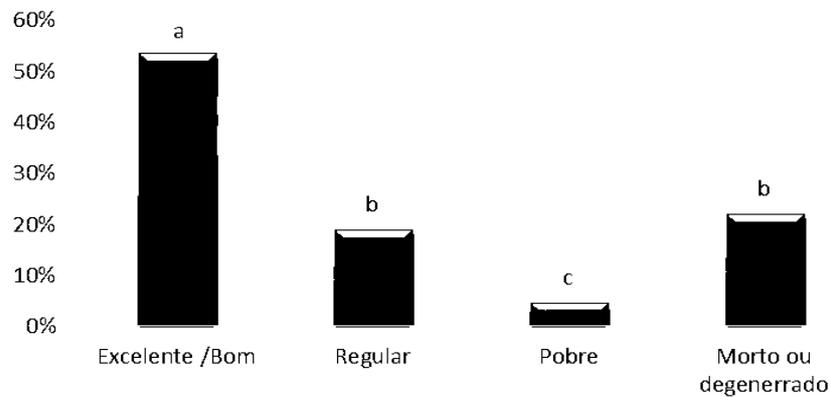


Figura 4: Grau de qualidade (Excelente ou Bom, Regular, Pobre e Morto ou Degenerado) de embriões produzidos *in vivo* a partir de ovelhas Dorper. <sup>a,b</sup> Letras diferentes entre graus de qualidade indicam diferença significativa ( $P < 0,001$ ).

A Tabela 1 aborda o efeito da interação uso ou não de sacarose na vitrificação e remoção ou não do crioprotetor após descongelação sobre os parâmetros *in vitro* dos embriões antes e depois do processo de criopreservação.

Tabela 1: Graus de qualidade (Excelente/Bom, Regular, Pobre e Morto; %), Grau de extrusão (Alto, Médio e Baixo), Grau de Homogeneidade da massa embrionária (Homogêneo, Levemente Heterogêneo e Heterogêneo), Presença ou Ausência de Retração ou Reexpansão embrionária, antes do processo de vitrificação e após a descongelação de embriões Dorper, produzidos *in vivo* e vitrificados na ausência de sacarose e submetidos a remoção do crioprotetor (Grupo A1) ou não (Grupo A2) à remoção do crioprotetor, bem como na presença de sacarose e submetidos (Grupo B1) ou não (Grupo B2) à remoção do crioprotetor.

	Pré-vitrificação				Pós-descongelação			
	Excelente	Regular	Pobre	Morto	Excelente	Regular	Pobre	Morto
A1(27)	66,7(18)	33,3(9)	0,0	0,0	55,56(15)	44,44 <sup>a</sup> (12)	0,0	0,0
A2(27)	70,4(19)	29,6(8)	0,0	0,0	55,56(15)	44,44 <sup>a</sup> (12)	0,0	0,0
B1(19)	89,5 <sup>A</sup> (17)	10,5 <sup>B</sup> (2)	0,0	0,0	78,94 <sup>A</sup> (15)	10,52 <sup>bB</sup> (2)	5,26 <sup>B</sup> (1)	5,26 <sup>B</sup> (1)
B2(17)	70,6(12)	29,4(5)	0,0	0,0	64,7(11)	35,29 <sup>ab</sup> (6)	0,0	0,0

	Nível de extrusão embrionária					
	Pré-vitrificação			Pós-descongelação		
	Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta
A1	81,48 <sup>A</sup> (22)	14,81 <sup>abB</sup> (4)	3,71 <sup>B</sup> (1)	59,26 <sup>A</sup> (16)	29,63 <sup>AB</sup> (8)	11,11 <sup>abB</sup> (3)
A2	62,96 <sup>A</sup> (17)	29,63 <sup>abB</sup> (8)	7,41 <sup>B</sup> (2)	37,04(10)	33,33(9)	29,63 <sup>a</sup> (8)
B1	94,74 <sup>A</sup> (18)	5,26 <sup>bB</sup> (1)	0,0 <sup>B</sup> (0)	47,37(9)	42,1(8)	10,53 <sup>ab</sup> (2)
B2	88,24 <sup>A</sup> (15)	11,76 <sup>abB</sup> (2)	0,0 <sup>B</sup> (0)	64,7 <sup>A</sup> (11)	29,41 <sup>AB</sup> (5)	5,88 <sup>bB</sup> (1)

	Grau de Homogeneidade Embrionária					
	Pré-vitrificação			Pós-descongelação		
	HO	LHE	HE	HO	LHE	HE
A1	51,85 <sup>A</sup> (14)	44,44 <sup>A</sup> (12)	3,71 <sup>B</sup> (1)	40,74 <sup>ab</sup> (11)	25,92(7)	33,33(9)
A2	70,37 <sup>A</sup> (19)	11,11 <sup>B</sup> (3)	18,52 <sup>B</sup> (5)	37,04 <sup>b</sup> (10)	25,92(7)	37,04(10)
B1	63,16 <sup>A</sup> (12)	26,31 <sup>B</sup> (5)	10,53 <sup>B</sup> (2)	68,42 <sup>aA</sup> (13)	15,79 <sup>B</sup> (3)	15,79 <sup>B</sup> (3)
B2	64,7 <sup>A</sup> (11)	17,65 <sup>B</sup> (3)	17,65 <sup>B</sup> (3)	58,82 <sup>abA</sup> (10)	11,76 <sup>B</sup> (2)	29,41 <sup>B</sup> (5)

	Retração		Ré-expansão	
	Pré-vitrificação		Pós-descongelação	
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
A1	3,71 <sup>B</sup> (1)	96,29 <sup>A</sup> (26)	85,19 <sup>A</sup> (23)	14,81 <sup>B</sup> (4)
A2	18,52 <sup>B</sup> (5)	81,48 <sup>A</sup> (22)	100 <sup>A</sup> (27)	0,0 <sup>B</sup>
B1	15,79 <sup>B</sup> (3)	84,21 <sup>A</sup> (16)	100 <sup>A</sup> (19)	0,0 <sup>B</sup>
B2	0,0 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup> (17)	100 <sup>A</sup> (17)	0,0 <sup>B</sup>

Letras maiúsculas (A, B) indicam diferença entre parâmetros ( $P < 0,05$ ).

Letras minúsculas (a, b) indicam diferença entre grupos ( $P < 0,05$ ).

Quanto ao grau de qualidade embrionária, no momento pré-vitrificação, foi observado uma proporção significativamente superior ( $P < 0,05$ ) de embriões Bons em relação à proporção de embriões Regulares, somente no grupo de

embriões vitrificados na presença de sacarose e submetidos à remoção de crioprotetores (grupo B1), não havendo porém, qualquer diferença significativa dentro dos demais grupos entre os graus de qualidade embrionária, e não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os grupos de interação (Tabela 1).

Já no momento pós-descongelamento, os embriões vitrificados na presença de sacarose e submetidos à remoção do crioprotetor (Grupo B1) foram, em sua maioria ( $P<0,05$ ), qualificados como Bons, quando comparados aos outros graus de qualidade embrionária, não havendo, porém, qualquer diferença significativa ( $P>0,05$ ) dentro dos demais grupos entre os graus de qualidade embrionária (Tabela 1).

Quando comparados os grupos de interação, observou-se uma menor ( $P<0,05$ ) proporção de embriões Regulares, ou seja, com menor qualidade embrionária, no grupo B1, quando comparada àquela nos grupos vitrificados na ausência de sacarose A1 e A2, ou seja, tanto naqueles em que houve quanto nos em que não houve remoção do crioprotetor, não havendo porém, diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre as proporções de embriões Regulares, entre os grupos congelados na presença de sacarose (Tabela 1).

Quanto ao nível de extrusão, no momento da pré-vitrificação, houve, em todos os tratamentos, uma superioridade ( $P<0,05$ ) de embriões com Baixo nível de extrusão, quando comparado com aqueles de níveis Médio e Alto. Porém, dentro do nível Médio de extrusão embrionária, houve uma superioridade ( $P<0,05$ ) do grupo de embriões vitrificados na ausência de sacarose e não submetidos à remoção do crioprotetor (Grupo A2), quando comparados àqueles vitrificados com sacarose e submetidos à remoção do crioprotetor (Grupo B1), sendo os demais grupos de interação, estatisticamente semelhantes ( $P>0,05$ ), para qualquer nível de extrusão, pré-vitrificação (Tabela 1).

Já no momento pós-descongelamento, somente o grupo de embriões vitrificados sem sacarose e submetidos à remoção do crioprotetor (grupo A1) e o grupo de embriões vitrificados com sacarose e não submetidos à remoção do crioprotetor (Grupo B2) apresentaram um maior ( $P<0,05$ ) percentual de embriões com Baixo nível de extrusão, quando comparado àqueles de nível Alto e não foi verificada demais diferenças entre níveis de extrusão, dentro de

cada grupo de interação. Além disso, um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) no número de embriões com níveis Altos de extrusão embrionária foi observado, quando vitrificados na ausência de sacarose e não submetidos à remoção do crioprotetor (Grupo A2), quando comparados àqueles vitrificados com sacarose e não submetidos à remoção do crioprotetor (Grupo B2) (Tabela 1).

Quanto à homogeneidade da massa embrionária, no momento pré-vitrificação, foi observado que, em todos os grupos de interação, houve uma superioridade estatística de embriões Homogêneos (HO) em relação aos Heterogêneos (HE). Além disso, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os grupos, dentro dos graus de homogeneidade.

Já no momento pós-descongelamento, foi verificado que, somente nos grupos vitrificados na presença de sacarose, (B1 e B2), houve um predomínio ( $P < 0,05$ ) de embriões HO, quando comparados aos embriões LHE e HE (Tabela 1). Além disso, a proporção de embriões HO, vitrificados na presença de sacarose e submetidos à remoção do crioprotetor (Grupo B1), foi superior ( $P < 0,05$ ) àquela de embriões vitrificados na ausência de sacarose e não submetidos à remoção do crioprotetor (Grupo A2) (Tabela 1).

Quanto ao percentual de embriões que apresentaram retração, em todos os grupos, houve um percentual significativamente ( $P < 0,05$ ) maior de embriões sem retração, quando comparado ao percentual de embriões retraídos. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos quanto à ocorrência de retração embrionária, no momento pré-vitrificação.

Quanto ao percentual de reexpansão, todos os grupos de interação apresentaram maiores ( $P < 0,05$ ) proporções de embriões com reexpansão, não havendo, porém, diferença estatística entre eles.

Conjugando-se os grupos A1 e A2 (Grupo A) e os grupos B1 e B2 (Grupo B), no momento pós-descongelamento, os embriões vitrificados sem sacarose (Grupo B) apresentaram uma proporção, significativamente maior ( $P < 0,05$ ) de embriões classificados como "Regular" (menor qualidade), quando comparados àqueles submetidos à vitrificação com sacarose (Grupo A) (44,5 vs. 22,2%).

Além disso, no momento pós-descongelamento, os embriões vitrificados com sacarose (Grupo B) e qualificados como Homogêneos apresentaram uma

significativa superioridade ( $P < 0,05$ ), quando comparados àqueles vitrificados na ausência de sacarose (Grupo A) (63,89 vs. 38,89%). Para nenhum outro parâmetro foi observada diferença significativa entre os grupos.

Já agrupando-se os embriões que foram submetidos a remoção do crioprotetor (A1 e B, formando o Grupo 1) e aqueles que não foram submetidos (A2 e B2, formando o Grupo 2), quanto à reexpansão embrionária pós-descongelamento, o percentual de embriões que não reexpandiu foi, significativamente maior (8,69 vs. 0,0%) nos embriões submetidos à remoção dos crioprotetores (Grupo 1) quando comparado aos embriões não submetidos a remoção do crioprotetor (Grupo 2). Para nenhum outro parâmetro avaliado foi encontrada diferença significativa entre os grupos.

## 7- Discussão

Os dados de ocorrência do estro do presente estudo estão de acordo com os encontrados por Vilariño et al. (2011) que, avaliando o desempenho do CIDR em cabras, encontraram também 100% das fêmeas em estro, bem como com os resultados encontrados por Padilha et al. (2011), trabalhando com ovelhas deslanadas.

Com relação ao intervalo entre a retirada do CIDR e o início do estro, o valor encontrado ( $16,6 \pm 2,84$  h) foi precoce quando comparado àquele encontrado por Nogueira et al. (2009), que utilizou um análogo da  $PGF_{2\alpha}$ , método menos eficiente quando comparado à utilização de progestágenos, devendo-se essa precocidade ao eficiente desbloqueio do eixo hipotalâmico-hipofisário após o fim desse tratamento, quando do uso de análogos da progesterona para sincronizar os estros.

Os dados de superovulação, tanto de fêmeas superovulando (95%) quanto de número de CLs ( $13,85 \pm 6,14$ ), foram semelhantes aos encontrados por Forcada et al. (2011). Os bons resultados de superovulação podem ser explicados pela correlação existente entre o momento do início do estro e o número de CLs produzidos. Sabe-se que quanto mais precoce for o início do estro, maior a quantidade de CLs produzidos, o que pode ser atribuído ao

maior número de folículos pré-ovulatórios produtores de estrógeno, no momento da retirada do dispositivo impregnado com progesterona, nos animais com maior número de CLs (KATANYA et al., 2009).

A grande maioria dos embriões produzidos apresentou um bom grau de qualidade, o que pode ser explicado pelo precoce início do estro, refletindo numa melhor qualidade de ovulação, ou seja, na liberação de oócitos mais propícios à fertilização, gerando embriões de melhor qualidade (BARIL et al., 1993).

Além disso, a origem dos embriões (produzidos *in vivo*) influencia positivamente a qualidade embrionária (MASSIP et al., 2001) e os embriões de qualidade Excelente ou Bom apresentam uma maior resistência ao processo de criopreservação, pois mostram uma notável superioridade nos aspectos morfológicos, metabólicos e número de células viáveis após a congelação (SHAMSUDDIN & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994; MASSIP et al., 1995; ABE et al., 1999; MOORE et al., 2007; RIZOS et al., 2008). Papadopoulos et al. (2002) encontraram taxas de gestação de 50% e 5% quando compararam embriões vitrificados em palhetas OPS *in vivo* e *in vitro*, respectivamente.

Os embriões vitrificados sem sacarose apresentaram uma quantidade maior de embriões com menor qualidade quando comparados aos embriões submetidos à vitrificação com sacarose, no momento da descongelação. Estes dados estão de acordo com Guignot et al. (2006) que encontraram taxas de parição de 56% e 27% quando compararam embriões caprinos vitrificados com ou sem sacarose, respectivamente. Esses mesmos autores também observaram uma tendência a aumentar a taxa de sobrevivência embrionária com o uso da sacarose.

Martinez et al. (2002), trabalhando com embriões bovinos, também observaram que a adição de sacarose promoveu um efeito protetor adicional para os embriões, no processo de vitrificação. A adição de sacarose possibilita a redução da quantidade necessária de crioprotetores intracelulares no processo de vitrificação (KASAI et al., 1996), o que diminui a toxicidade da solução e beneficia a qualidade embrionária pós-descongelação. Além disso, este açúcar proporciona um efeito osmótico adicional, acelerando a desidratação da célula, diminuindo o tempo disponível para a entrada de

crioprotetores intracelulares e reduzindo também o risco de formação de cristais de gelo intracelulares (SZELL & SHELTON, 1986; KASAI et al., 1990).

Portanto, o fato dos embriões vitrificados na presença de sacarose terem apresentado melhores resultados quanto ao grau de qualidade, percentual de extrusão, homogeneidade e taxa de ré-expansão embrionária, quando comparados ao grupo vitrificado sem sacarose, pode estar relacionado à melhor estabilidade de membrana, ao melhor efeito osmótico e à maior proteção fornecida pela sacarose.

A viabilidade embrionária pós-descongelação pode ser influenciada pela idade, estágio de desenvolvimento e qualidade do embrião (LEIBO & LOSKUTOFF, 1993), podendo ser verificada por diferentes métodos, sendo um destes, a taxa de reexpansão (MARTINEZ et al., 1998).

Os dados de embriões submetidos ou não à remoção do crioprotetor mostraram que os embriões não submetidos à manipulação necessária para a remoção do crioprotetor apresentaram taxas de reexpansão superiores. Estes resultados estão de acordo com BARIL et al. (2001), que mostraram que os embriões vitrificados podem ser transferidos diretamente com o conteúdo da palheta, ou seja, sem a remoção do crioprotetor. Estes mesmos autores (BARIL et al., 2001) afirmam que 15% a 20% dos embriões descongelados são descartados por conta do exame morfológico após a descongelação. Sendo assim, a transferência direta de embriões vitrificados representa um ganho potencial de 7% a 8%, em termos de cordeiros nascidos, podendo, desta forma, aumentar a proporção de ganho em relação ao custo da (MOTE) em ovelhas.

Isso também mostra que a avaliação morfológica de embriões vitrificados-descongelados pode não ser necessária e conduz à eliminação de embriões viáveis pela excessiva manipulação ou que os métodos utilizados para remoção do crioprotetor são menos eficientes do que na transferência direta. Além disso, o uso dessa técnica dispensa a necessidade de um técnico com experiência na avaliação de embriões (BARIL et al., 2001).

Guignot et al. (2006) também encontraram valores estatisticamente semelhantes ao comparar embriões caprinos vitrificados e transferidos direta ou indiretamente, quanto às taxas de sobrevivência embrionária.

Quanto às avaliações *in vitro* dos embriões feitas após os protocolos de descongelamento, foi observado que a adição de sacarose ao meio de vitrificação apresentou uma significativa melhora nos parâmetros *in vitro* dos embriões, tanto transferidos indiretamente quanto nos transferidos diretamente.

## **8- Conclusões**

Desta forma, pode-se concluir que a adição de sacarose ao meio de vitrificação de embriões Dorper produzidos *in vivo* proporcionou uma melhor qualidade *in vitro* dos embriões vitrificados antes e após o processo de criopreservação, além disso a transferência direta foi possibilitada em embriões Dorper produzidos *in vivo* pela adição de sacarose ao meio de vitrificação, sem causar prejuízos significativos para estes.

## 9. REFERÊNCIAS

ABE , Y.; HARA, K.; MATSUMOTO, H.; KOBAYASHI J, SASADA H, EKWALL H, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, SATO E. Feasibility of a nylon mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocyst. *Biology of Reproduction*, v.72, p.1416-1420, 2005.

ABE, H. OTOI, T. TACHIKAWA, S. YAMASHITA, S. SATOH, T & HOSHI, H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts in vivo and in vitro. *Anatomy and Embryology*, v.199, p. 519-527, 1999.

ACORSI, M.F. Avaliação de embriões bovinos cultivados in vitro na presença de ácidos graxos e sua sobrevivência pós-criopreservação. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo, p. 77, 2008.

ALLER, J. F.; ALBERIO, R. H.; IOVANNITTI, B.; CABOCEVILA, J. Criopreservación de embriones mamíferos 1ª parte. Características generales de La congelación . *Revista de Medicina Veterinária*, v. 76, p. 132-136, 1995.

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

ALVARENGA, M. A.; FERNANDES, C. B.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Criopreservation of equine embryos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p. 799-809, 2007.

ALVAREZ, R. H. Recentes progressos na superovulação dos bovinos. In: IX REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 1994, Nova Odessa. Anais... Nova Odessa, p. 32, 1994.

ARAV, A.; RUBINSKY, B.; SEREN, E.; ROCHE, J.; BOLAND, M. The role termal hyteresis proteins during criopreservation of oocyrtes and embryos. *Theriogenology*, v.41, p.107-112, 1994.

ARAV, A; ZERON, Y; OCHERETNY, A. A new device and method for vitrification increases the cooling rate and allows successful cryopreservation of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.53, p. 248, 2000.

BAKER, R. L.; REGE, J. E. O.; TEMBELY, S.; MUKASA-MUGERWA, E.; ANINDO, D.; MWAMACHI, D. M.; THORPE, W.; LAHLOU-KASSI, A. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in some indigenous breeds of sheep and goats in East Africa. In: Proc. 6th Proc. 5th Wld. Cong. Genetics Appl. Livest. Prod, v.25, p. 269-272, 1998.

BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. Manual de Formación Práctica para el Trasplante de Embriones en Ovejas y Cabras. FAO, p.182, 1995.

BARIL, G.; REMY, B.; LEBOEUF, B.; BECKERS, J. F.; SAUMANDE, J. Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*, v.45, n.2, p.1553-1559, 1993.

BARIL, G.; TRALDI, A. L.; COGNIÉY, LEBOEUF, B.; CBECKERS, J. F.; MERMILLOD, P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, v.56, p.299-305, 2001.

BARRY D. M.; VAN NIEKERK C. H.; RUST J.; VAN DER WALT T. Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E2 and estradiol. *Theriogenology*, v. 33, p.190, 1990.

BASSON, W. D.; VAN NIEKERK, B. D. H.; MULDER, A. M.; CLOETE, J. G. The productive and reproductive potential of three sheep breeds mated at 8-monthly intervals under intensive feeding conditions. *Proceedings Society for Animal Production*, v. 8, p. 149-154, 1969.

BAUDOT, A.; ALGER, L.; BOUTRON, P. Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, v.40, p.151-158, 2000.

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.

BLANCO, M. R.; SIMONETTI, L.; RIVERA, O.E. Embryo production and progesterone profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments. *Small Ruminant Research*, v. 47, p. 183-191, 2003.

BROCKBANK, K. G. M.; COVAULT, J. C.; TAYLOR, M.J. Cryobiology and cryopreservation. In: Brockbank KGM, Covault JC, Taylor MJ. *Cryopreservation manual: a guide to cryopreservation techniques*. Marietta, OH: Thermo Electron Corporation, p. 24, 2001.

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.

COGNIÉ, Y. State of art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v. 51, p. 105-116, 1999.

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

CLINE, M.A.; RALSTON, J.N.; SEALS, C.; LEWIS, G. S. Intervals from norgestomet withdrawal and injection of equine chorionic gonadotrophin or P.G. 600 to estrus and ovulation in ewes. *Journal of Animal Science*, v.79, p.589-594, 2001.

CROWE, J.; CROWE, L.; MOURADIAN, R. Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiology*, v. 20, p.346-356, 1983.

DALCIN, L.; LUCCI, C.M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, p.149-159, 2010.

D'ALESSANDRO, A., MARTEMUCCI, G., TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology*, v. 63, p. 1764-1774, 2005.

DATTENA M, PTAK G, LOI P, CAPPAIR P. 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., 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.

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

DUBY, R. T.; HILL, J. L.; O'CALLAGHAN, D.; OVERSTROM, E. W.; BOLAND, M. P. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology*, v. 47, p. 332, 1997.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal in Reproduction Fertility*, v.47, p.243-255, 1993.

EMBRAPA. Centro de pesquisa agropecuária do trópico semi-árido (Petrolina-PE). Relatório de pesquisa do centro de pesquisa agropecuária do trópico semi-árido, CPATSA, 1979-1990. Petrolina, PE: Embrapa, p. 145, 1993.

ELTAWIL, E. A.; NARENDRAN, R. Ewe productivity in four breeds of sheep in Saudi Arabia. *Wld. Rev. Anim. Prod.* 25 (1), 93-96, 1969.

FERNANDES C.A.C. Superovulação em bovinos. 2003b. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br>. Acesso em: 26 de novembro de 2012.

FOLCH, J.; RAMON, J.P.; COCERO, M.J.; ALABART, J.L.; BECKERS, J.F. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology*, v. 55, p. 1777-1765, 2001.

FORCADA, F.; AMER-MEZIANE, M.; ABECIA, J.A.; MAUREL, M.C.; CEBRIÁN-PEREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T.; ASENJO, B.; VÁZQUEZ, M.I.; CASAO, A. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. *Theriogenology*, v.75, p.769-776, 2011.

FREITAS, V. J. F.; SIMPLÍCIO, A. A. Transferência de embriões em caprinos, *Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal*, c. 9, p. 179- 194, 2001.

FRIEDLER, S.; GIUDICE, L. C.; LAMB, E. J. Criopreservação de embriões and ova. *Fertility and Sterility*, v.49, p. 743-764, 1988.

GARCIA-GARCIA, M. R.; GONZALEZ-BULNES, A.; DOMINGUEZ, V.; VEIGALOPES, A.; COCERO, M. J. Culture of early stage ovine to blastocyst enhances survival rate after cryopreservation. *Theriogenology*, v.63, p.2233-2242, 2005.

GARCIA-GARCIA, M. R.; GONZALEZ-BULNES, A.; DOMINGUEZ, V.; VEIGALOPES A, COCERO MJ. Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. *Cryobiology*, v.55, p.108-113, 2006.

GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas a reprodução animal, ed.1 Varela, São Paulo, 2001.

GORDON I. Storage and cryopreservation of oocytes and embryos. In: Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB international, 1994. p.293-328.

GREEN, R.E.; SANTOS, B. F. S.; SICHERLE, C. C.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S. D. Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, p. 406-410, 2009.

GREYLING, J.P.C.; NEST, M.V.D.; SCHWALBACH, L.M.J.; MULLER, T. Superovulation and embryo transfer in South African Boer and Indigenous feral goats. *Small Ruminant Research*, v.43, p. 45-51, 2002.

GUIGNOT, F.; BOUTTIER, A.; BARIL G.; SALVETTI , P.; PIGNON, P.; BECKERS, J.F.; TOUZE', J.L.; COGNIE', J.; TRALDI, A.S.; COGNIE', Y.; MERMILLOD, P. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology*, v.66, p. 1004–1011, 2006.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. 7. ed. Barueri: Manole, 2004

HAMANO, S.; KOIKEDA, S.; KUWAYAMA, M.; NAGAI, T. Full-term development of in vitro matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, v.38, p.1085-1090, 1992.

HONG, Q. H.; TIAN, S. J.; ZHU, S. E.; FENG, J. Z.; YAN, C. L.; ZHAO, X. M.; LIU, G. S.; ZHENG, S. M. Vitrification of Boer goat morulae and early blastocysts by straw and open-pulled straw method. *Reproduction Domestic Animal*, v. 42, p. 34-38, 2007.

HOPPE, K. F.; SLYTER, A. L. Effects of prostaglandin dosage on synchronizing ovine estrous using a modified single injection regimen. *Theriogenology*, v.31, p. 1191-1200, 1989.

HURTT, A. E. Vitrification of equine and bovine oocytes using open pulled straws. Dissertation (Master of Science)- Colorado States University, Colorado, 1999.

IM, K. S.; KANG, J. K.; KIM, H.S. Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and pre-incubation before insemination on development capacity of frozen-thawed bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 47, p. 881-891, 1997.

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

ISHWAR, A .K.; MEMON, M. A . Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*, v. 19, p. 35-46, 1996.

JIN, B.; KUSANAGI, K.; UEDA, M.; SEKI VALDEZ, J. R. D. M, EDASHIGE, K.; KASAI, M. Formation of extracellular and intracellular ice during warming of vitrified mouse morulae and its effect on embryo survival. *Cryobiology*, v.56, p.233-240, 2008.

KAROW, A. M. *Cryobiology 2001 for mammalian embryologists*. Augusta Georgia USA, 2001 (Xytex Corporation). Disponível em: <http://www.xytexinternational.com/pdf/cryobiology.pdf> . Acesso em: 20 de novembro de 2012.

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

KASAI, M.; KOMI, J. H.; TAKAKAMO, A. TSUDERA, H.; SAKURAI, T.; MACHIDA, T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *Journal Reproduction fertility*, v. 89, p. 91-97, 1990.

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.

KATANYA, J. F.; PAWEL, M. B.; KING, W.A. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrous ewes following a multiple-dose pFSH regimen. *Small Ruminant Research*, v. 82, p. 144–148, 2009.

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

KULESHOVA L.L.; LOPATA, A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility.*, v.78, p449-454, 2002.

KUWAYAMA M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the cryotop method. *Theriogenology*, v.67, p.73-80, 2007.

LEIBO, S. P.; LOSKUTOFF, N. M. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, v. **39**, p. 81–94, 1993.

LEIBO, S. P. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology*, v.69, p.37-47, 2008.

LIM, K. T.; JANG, G.; KO, K. H.; LEE, W.W.; PARK, H. J.; KIM, J. J.; KANG, S. K.; LEE, B. C. Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. *Animal Reproduction Science*, v. 103 p. 239–248, 2008.

LIMA VERDE, J. B.; LOPES Jr, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; PAULA, N. R. O.; MEDEIROS, A. A.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. *South African Journal Animal Science*, v.33, p.127-131, 2003.

MANI, A.U.; WATSON, E.D.; McKELVEY, W. A. C. The effects of subnutrition before or after embryo transfer on pregnancy rate and embryo survival. *Theriogenology*, v.41, p.1673-1678, 1994.

MAPLETOFT, R. J.; STOOKEY, J. M. Procedimentos sanitários gerais e considerações de bem estar associados com a produção *in vivo* de embriões. In: *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 3.ed. Champaign, IL: IETS, 1998. 180p.

MARTINÉZ, A. G.; MOTOS, D. G.; FURNUS, C. C.; BROGLIATTI, G.M. *in vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology*, v. 50, p. 757-767, 1998.

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

MARTINEZ, A. G.; VALCÁRCEL, A.; FURNUS, C. C.; MATOS, D. G.; IORIO, G.; HERAS, M. A. Cryopreservation of *in vitro*-produced ovine embryos. *Small Ruminant Research*, v.63, p.288-296, 2006.

MARTÍNEZ, J.J.; IZAGUIRRE, F.; SÁNCHEZ, L.; GARCÍA, C. G.; MARTÍNEZ, G. HERNÁNDE, G. T. Comportamiento reproductivo de ovejás Barbados

Barriga Negra sincronizadas con MPA y diferentes tiempos de aplicación de eCG durante la época de baja fertilidad. *Revista Científica*, v.17, p.47-52, 2007.

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

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

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals*, v.36, p.49-55, 2001.

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

MCGINNIS, L.K.; DUPLANTIS, S. C.; YOUNGS, C. R. Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. *Animal Reproduction Science*, v.30, p.273-280, 1993

MOORE, K.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C. J.; KRAMER, J. M.; JOHNSON, S.; WROCLAWSKA, E.; GOICOA, S.; NIASARI-NASLAJI, A. In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocysts development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology*, v. 68, p. 1316-1325, 2007.

MORAND-FEHR, P.; HERVIEU, J. apprécier l'comer Corporel des Chèvres: interet et método. *Réussir La Chevre*, v.231, p.22-34, 1999.

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.

NAQVI, S.M.K.; GULYANI, R.; JOSHI, A.; DAS, G.K.; MITTAL, J.P. Effect of dietary regimens on ovarian response and embryo production of sheep in tropics. *Small Ruminant Research*, v. 46, p. 167–171, 2002.

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

NOGUEIRA, D. M.; LOPES Jr, E. S.; SOUSA, P. H. F.; CARVALHO JÚNIOR, G. M. Efeito da sincronização do estro com dupla aplicação de d-cloprostenol associada ou não à eCG sobre o desempenho reprodutivo de cabras ½ Boer/SRD exploradas na região semiárida do Nordeste do Brasil. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n. 2, p. 618-626, 2009.

NRC, 1985. Nutrient requirements of sheep. *Nutrient Requirements of Domestic Animals*, National Academy Press, Washington.

OLDHAM, C.M.; LINDSAY, D.R. Laparoscopy in the ewe: a photographic record of the ovarian activity of ewes experiencing normal or abnormal oestrous cycles. *Animal Reproduction Science*, v. 3, p. 119-124, 1980.

OLIVEIRA, V.S.; GONZALES, C.I.M. Transferência de embriões em caprinos. I Simpósio nordestino sobre caprinos e ovinos deslanados. *Anais...* 21-32p, 1992.

ONGARATTO, L. T. Criopreservação de embriões bovinos. Trabalho de monografia (graduação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

PADILHA, T.R; MAGALHÃES, D. M; MAIA-JUNIOR, A.; BRASIL, F. A; ARAÚJO, A. A. Efeito de diferentes dispositivos intravaginais na sincronização estral e taxa de gestação em ovelhas deslanadas submetidas à IATF via

cervical superficial com sêmen refrigerado. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.6, n.3, p.538-543, 2011.

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. *Animal Reproduction Science*, v.74, p. 35-44, 2002.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. The effect of gentle pre-equilibration on survival and development rates of bovine in vitro matured oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, v. 51, p. 173, 1999.

PAPIS, K.; SHIMIZU, M.; IZAIKE, Y. Factors affecting survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*, v.54, p.651-658, 2000.

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

PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation. In: *Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings...* v.4, 1986.

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

RALL, W. F. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Animal Reproduction Science*, v.28, p.237-245, 1992.

REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; FILHO, A. S. S.; ANDRADE, J. C. Transferência e criopreservação de embrião bovino. In: GONÇALVES, P.B.; FIGUEIREDO J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, p.127-178, 2002.

RIZOS, D.; CLEMENTE, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; DE LA FUENTE, J.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Consequences of in vitro culture

conditions on embryos development and quality. *Reproduction in Domestic Animal*, v.43, p. 44-55, 2008.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. Certification and identification of embryos. In: D.A. Stringfellow; S.M. Seidel (eds.), *Proceedings of Guide of International Embryo Transfer Society*, p.109-122, 1999.

RUMPF, R.; DE BEM, A. R.; PEIXER, M.A.S.; SOUSA, R.V. *Manual do XII Curso de Transferência e Micromanipulação de Embriões*. Brasília, 1997.

SAITO, N.; IMAI, K.; TOMIZAW, A. M. Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, v.41, p. 1053-1060, 1994.

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

SEIDEL Jr., G. E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: *Techniques for freezing mammalian embryos: short course proceedings*. *Proceedings...* v.6, 1986.

SEIDEL Jr., G. E. Criopreservação de equine embryos. *Veterinary Clinics of North America: Equine Pract.*,v.12, p.85-99, 1996.

SELVARAJU, S.; AGARWAL, S.K.; KARCHE, S.D.; MAJUMDAR, A.C. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats. *Theriogenology*, v. 59, p. 1459-1468, 2003.

SEEN, B. J.; RICHARDSON, M. E. Seasonal effects on caprine response to synchronization of estrus and superovulatory treatment. *Theriogenology*, v.37, p.579-585,1992.

SHAMSUDDIN, M.; LARSSON, B.; GUSTAFFSON, H.; GUSTARI, S.; BARTOLOME, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparative morphological evaluation of *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos. *International Congress on Animal Reproduction*, v. 3, p. 1333-1335, 1992.

SHAMSUDDIN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fine structure of bovine blastocyst developed either in sérum free médium or in conventional co-culture epithelial cells. *Journal of Veterinary Medicine*, v.41, p. 307-316, 1994.

SHISONG, C. & WRATHALL, E. The importance of the zona pellucida for disease control in livestock by embryo transfer. *British Veterinary Journal*, v.145, p. 129-140, 1989.

SCHOEMAN, S.J., BURGER, R. Performance of Dorper sheep under an accelarated lambing system. *Small Ruminant Research*, v. 9, p.265-281, 1992.

SINGH, E.L. The disease control potential of embryos. *Theriogenology*, v.27, p. 9–20, 1987.

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.

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.

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

TERVIT, H. R. Factors affecting the success of goat embryo transfers. *Proceedings Animal Science Congress*, p. 262-266, 1987.

TORRES, S.; SEVELLEC, C. Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe. *Reproduction Nutrition Development*, v.27, p. 859-863, 1987.

URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; OBA, E.; SOUZA, M.I.L. Población follicular y concentraciones plasmáticas de progesterone (P4) en ovejas sometidas a diferentes protocolos de sincronización. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.40, p.83-88, 2008.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. The submarine incubation system, a new tool for in vitro embryo culture a technique report. *Theriogenology*, v.48, p. 1379-1385, 1997.

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

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

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

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R. M.; DOMINGUEZ, V.; COCERO, M. J. The effects of previous ovarian status on

ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology*, v. 63, p. 1973–1983, 2005.

VIEIRA, A.D; FORELL, F.; FELTRIN, C.; RODRIGUES, J.L. Calver 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.

VILARIÑO, M.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Re-use of intravaginal progesterone devices associated with the Short-term Protocol for timed artificial insemination in goats. *Theriogenology*, v.75, p.1995-1200, 2011.

VISSER, J. A. An evaluation of basic production characteristics of three South African sheep genotypes under an intensive production system, M.Sc. Agric. thesis, University of Pretoria, 1991.

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.

WOODS, E.J.; BENSON, J.D.; AGCA, Y.; CRITSER, J. K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, v.48, p.146-156, 2004.

WOWK, B.; LEITL, E.; RASCH, C.M.; MESBAH-KARIMI, N; HARRIS, S.B.; FAHY, G.M. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, v.40, p.228-236, 2000.

YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, v.67, p.81-89, 2007.

YOUNG, E.; KENNY, A.; PUIGDOMENECH, E., VAN THILLO, G.; TIVERON,

G.; PIAZZA, A. Human oocyte cryopreservation and pregnancy. *Fertility and Sterility*, v.70 s. 16, 1998.

