



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO, PADRÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL
E ULTRAESTRUTURA DE EMBRIÕES OVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO*
CONGELADOS OU VITRIFICADOS EM ETILENOGLICOL**

LUCIANA DALCIN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2010**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO, PADRÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL
E ULTRAESTRUTURA DE EMBRIÕES OVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO*
CONGELADOS OU VITRIFICADOS EM ETILENOGLICOL**

ALUNA: Luciana Dalcin

ORIENTADORA: Carolina Madeira Lucci

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 026/2010

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2010**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO, PADRÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL
E ULTRAESTRUTURA DE EMBRIÕES OVINOS PRODUZIDOS *IN VIVO*
CONGELADOS OU VITRIFICADOS EM ETILENOGLICOL**

LUCIANA DALCIN

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADO POR:

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Dra. (UnB)
(ORIENTADORA)**

**MARGOT ALVES NUNES DODE, Dra. (Embrapa-Cenargen)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**ANA PAULA RIBEIRO RODRIGUES, Dra. (UECE)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 24 de FEVEREIRO de 2010
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DALCIN, L. Avaliação do citoesqueleto, padrão de atividade mitocondrial e ultraestrutura de embriões ovinos produzidos in vivo congelados ou vitrificados em etilenoglicol. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 66 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

DALCIN, Luciana. **Avaliação do citoesqueleto, padrão de atividade mitocondrial e ultraestrutura de embriões ovinos produzidos in vivo congelados ou vitrificados em etilenoglicol.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2010.

1. Criopreservação. 2. Microscopia Eletrônica de Transmissão. 3. Confocal. 4. Organelas. I. Dalcin, L. II. Título.

CDD ou CDU
Agris/ FAO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família. Meus pais, Nelito José Dalcin e Berandete Sebastiana Bruno, pelo amor, educação, construção de valores, total apoio e confiança. Aos meus irmãos Nelito José Dalcin Júnior e Juliana Maria Dalcin, pelo amor incondicional, amizade, ajuda em minha manutenção em Brasília e apoio nos momentos que mais precisei. Ao meu fiel companheiro, Duque, que esteve ao meu lado por anos, grande incentivo nos meus estudos em Medicina Veterinária, mas que, infelizmente, não estará mais em casa quando eu voltar.

A todas essas pessoas que amo mais que tudo, o meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha saúde, por tudo que foi posto em meu caminho, fatos que me ajudaram a formar a pessoa que sou hoje e obrigada pela possibilidade em agradecer a todas as pessoas que me ajudaram neste trabalho e passaram a fazer parte da minha vida.

Obrigada à minha orientadora Profa. Dra. Carolina M. Lucci ou simplesmente Carol... Chefia, que se tornou para mim mais que uma orientadora, um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido, que me deu um crédito de confiança quando lhe pedi a oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação, praticamente sem me conhecer.

Ao Prof. Dr. Jairo Pereira Neves, pela importante ajuda na realização das colheitas dos embriões, assim como os amigos Bianca Damiani e Thiago Silva, que tornaram possível um ótimo trabalho em equipe.

A todos os amigos do ReproUnB, em especial à Renata Carvalho, por sua amizade, companhia e fundamental ajuda na avaliação no microscópio confocal. À Denise Caldeira, pela amizade e ajuda nos trabalhos no CMO. À Martha Rocha (Marthinha), pelo carinho, atenção e amizade oferecida em momentos difíceis durante minha estadia em Brasília.

Em especial a Antônio Carlos Lopes Câmara, pelo grande incentivo em meu ingresso no mestrado, pelo carinho, companhia e por ceder seu carro, fundamental para a realização do experimento.

A todos os funcionários do CMO da Fazenda Água Limpa, principalmente ao Antônio e ao médico veterinário Bruno Dallago, pela disposição em ajudar no que fosse possível no manejo dos animais.

À Profa. Dra. Sônia Bão, por ceder as dependências de seu laboratório para o processamento e análise no MET e no confocal, e a todos do laboratório de Microscopia Eletrônica, pela acolhida e ajuda sempre que possível.

À Dra. Margot Nunes Dode e à Grazielle Marinheiro, pela atenção e fundamental ajuda, dentre elas a disponibilidade de embriões para a padronização da técnica no microscópio confocal.

A todos estes profissionais e amigos o meu sincero agradecimento e reconhecimento da importância de cada um deles para a conclusão deste trabalho, obrigada!

Agradeço também à CAPES, pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos durante todo o mestrado, à FINEP , FAP-DF e CNPq pelo apoio financeiro para realização do experimento.

“O que não dá prazer não dá proveito.

*Em resumo, senhor,
estude apenas o que lhe agradar.”*

Willian Shakespear

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELA	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
CAPITULO 1	01
1 INTRODUÇÃO	02
1.1 Objetivos	04
1.1.1 Geral	04
1.1.2 Específicos	04
2 REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1 Princípios Criobiológicos e Crioprotetores	05
2.2 Eficiência da Criopreservação e Principais Crioinjúrias	08
2.3 Congelação Lenta de Embriões	10
2.4 Vitrificação de Embriões	12
2.5 Criopreservação de Embriões Ovinos	14
2.6 Métodos de Avaliação Embrionária	18
2.6.1 Estereomicroscopia	18
2.6.2 Microscopia óptica ou de luz	18
2.6.3 Microscopia de fluorescência e confocal	19
2.6.4 Microscopia eletrônica de transmissão	20
CAPITULO 2	21
TÍTULO	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO	24
2 MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.1 Obtenção dos Embriões	26
2.2 Congelação Lenta e Descongelação	28
2.3 Vitrificação em OPS e Aquecimento	28
2.4 Cultivo <i>in Vitro</i>	29
2.5 Análise de Atividade Mitocondrial e Estrutura do Citoesqueleto	29
2.6 Avaliação Ultraestrutural	30
2.7 Análise Estatística	31
3 RESULTADOS	32
3.1 Avaliação no Estereomicroscópio	32
3.2 Análise do Padrão de Atividade Mitocondrial e Citoesqueleto	33
3.3 Avaliação Estrutural	37
3.4 Avaliação Ultraestrutural	42
4 DISCUSSÃO	50
5 CONCLUSÕES	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
CAPÍTULO 3	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS	66

**AVALIAÇÃO DO CITOESQUELETO, PADRÃO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL
E ULTRAESTRUTURA DE EMBRIÕES OVINOS CONGELADOS OU
VITRIFICADOS EM ETILENOGLICOL**

Luciana Dalcin¹, Carolina Madeira Lucci²

¹Universidade de Brasília, ²Profa. Dra. Universidade de Brasília

RESUMO

A criopreservação de embriões ovinos tem sido amplamente difundida, porém seus índices de sobrevivência e prenhez têm mostrado grande variação. Neste estudo, embriões produzidos *in vivo* foram congelados ou vitrificados e reaquecidos para avaliação ultraestrutural e determinação do padrão de atividade mitocondrial e integridade do citoesqueleto. Os embriões foram colhidos de ovelhas superovuladas, classificados e selecionados para criopreservação. Embriões submetidos à congelação lenta (n=22) foram expostos à solução de 0,75M de etilenoglicol (EG) por 10 minutos, 1,5M de EG por 10 minutos, acondicionados em palhetas de 0,25mL e submetidos a curva de congelação programável (-1°C/min, *seeding* a -7°C, 0,3°C/min até -35°C) com posterior imersão em nitrogênio líquido. Embriões vitrificados (n=24) foram submetidos à solução de 10% de EG+10% de DMSO por 1 minuto e 30 segundos, passando para a solução de 20% de EG+20% de DMSO com 0,5M de sacarose por 30 segundos acondicionados em OPS e mergulhados em nitrogênio líquido. Os embriões descongelados/reaquecidos foram cultivados por 1 hora, reclassificados em estereomicroscópio e subdivididos para avaliação. Os embriões criopreservados mostraram variável grau de desorganização de citoesqueleto e ausência de marcação para atividade mitocondrial. Foi possível correlacionar os achados anteriores com a ultraestrutura e distribuição das organelas pelo citoplasma. Embriões congelados mostraram características ultraestruturais semelhantes a embriões frescos de mesma qualidade. Embriões vitrificados apresentaram maior frequência de grandes vesículas de digestão.

Palavras chave: congelação lenta, vitrificação, microscopia eletrônica de transmissão, confocal, organelas.

**EVALUATION OF THE CYTOSKELETON, PATTERN OF MITOCHONDRIAL
ACTIVITY AND ULTRASTRUCTURE OF SHEEP EMBRYOS FROZEN OR
VITRIFIED IN ETHYLENE GLYCOL**

Luciana Dalcin¹, Carolina Madeira Lucci²

¹Universidade de Brasília, ²Profa. Dra. Universidade de Brasília

ABSTRACT

Cryopreservation of sheep embryos has been widespread, but their survival rate and pregnancy have shown great variation. After in vivo production sheep embryos were frozen or vitrified and processed for ultrastructural evaluation and determining the pattern of mitochondrial activity and integrity of the cytoskeleton. Embryos were collected from superovulated ewes, classified and selected for cryopreservation. Embryos subjected to slow freezing (n = 22) were exposed to 0.75 M ethylene glycol (EG) for 10 minutes, 1.5M EG for 10 minutes, packed in 0.25mL straws and subjected to programmable freezing (-1 ° C / min, seeding at -7 ° C, 0.3 ° C / min to -35 ° C) followed by immersion in liquid nitrogen. Vitrified embryos (n = 24) were placed in 10% EG +10% DMSO solution for 1 minute and 30 seconds, then in 20% EG +20% DMSO solution with 0,5M sucrose for 30 seconds packed in OPS and dipped in liquid nitrogen. The cryopreserved embryos were warmed, cultured for 1 hour, reclassified and subdivided for evaluation. Cryopreserved embryos showed variable degree of cytoskeleton disorganization and no marker for mitochondrial activity. It was possible to correlate these findings with the ultrastructure and distribution of the organelles. Frozen embryos showed ultrastructural features similar to fresh embryos of the same quality. Vitrified embryos showed a higher frequency of large digestion vesicles.

Keywords: slow freezing, vitrification, transmission electron microscopy, confocal, organelles

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. . Desenho esquemático do delineamento experimental. At.: atividade.	27
Figura 2. Avaliação no microscópio confocal dos filamentos de actina (verde) e padrão de atividade mitocondrial (vermelho) de embriões frescos.	34
Figura 3. Avaliação no microscópio confocal dos filamentos de actina de embriões frescos.	35
Figura 4. Avaliação no microscópio confocal dos filamentos de actina (verde) e padrão de atividade mitocondrial (vermelho) de embriões frescos. Blastocisto expandido de grau I.	35
Figura 5. Avaliação no microscópio confocal dos filamentos de actina de embriões congelados/descongelados após 1hora de CIV.	36
Figura 6. Avaliação no microscópio confocal dos filamentos de actina de blastocisto expandido de grau I vitrificados/aquecidos após 1hora de CIV.	37
Figura 7. Embriões frescos em diferentes fases de desenvolvimento e avaliados por microscopia óptica	38
Figura 8. Embriões avaliados na microscopia óptica após congelação lenta	40
Figura 9. Embriões avaliados na microscopia óptica após vitrificação.	41
Figura 10. Embriões frescos avaliados por microscopia eletrônica de transmissão.	43
Figura 11. Embriões frescos avaliados em microscopia eletrônica de transmissão	44
Figura 12. Embriões congelados/descongelados avaliados por microscopia eletrônica de transmissão.	46
Figura 13. Embriões congelados/descongelados avaliados em microscopia eletrônica de transmissão.	47
Figura 14. Embriões vitrificados/aquecidos avaliados por microscopia eletrônica de transmissão.	48

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Relação dos embriões que mantiveram sua qualidade, diminuíram para grau II ou III ou degeneraram após o reaquecimento e CIV por 1hora.	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C/min: grau por minuto
μL: microlitro
μg: micrograma
μm: micrômetro
CCf: grupo controle avaliado por microscopia confocal
CIV: cultivo *in vitro*
CLCf: grupo congelado avaliado por microscopia confocal
CLMET: grupo congelado avaliado por microscopia eletrônica de transmissão
CMET: grupo controle avaliado por microscopia eletrônica de transmissão
CO₂: dióxido de carbono
DAPI: 4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride
DMSO: dimetil sulfóxido
eCG: Equine Corionic Gonadotrofin - Gonadotrofina Coriônica Equina
EG: etilenoglicol
FSH: Follicule Stimulant Hormone - Hormônio Folículo Estimulante
IETS: International Embryo Transfer Society - Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
Kg: quilograma
M: molar
MAP: acetato de medroxiprogesterona
MCI: massa celular interna
MET: microscópio eletrônico de transmissão
mg: miligramas
mL: mililitro
mM: milimolar
nm: nanômetro
OPS: *Open Pulled Straws*
PBSplus: Phosphate Buffer Saline – Tampão Salino Fosfato adicionado 20% de soro fetal bovino
PIV: produzido *in vitro*
PVP: polivinilpirrolidona
SFB: soro fetal bovino
UI: unidades internacionais
VCf: grupo vitrificado avaliado por microscopia confocal
VMET: grupo vitrificado avaliado por microscopia eletrônica de transmissão
TE: transferência de embriões

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho ovino com mais de 15 milhões de cabeças, que ainda não está totalmente estabelecido, pois existe uma grande migração desta atividade para a região Centro-Oeste e Sudeste (Alencar & Rosa, 2006), que alcançam 5,5% e 3,39% de representatividade no rebanho nacional, respectivamente (Martins et al., 2006). Como consequência deste avanço, as biotécnicas reprodutivas tornam-se fundamentais para o incremento da rentabilidade do agronegócio de pequenos ruminantes, conferindo a maximização do potencial reprodutivo de animais de alto valor genético (Pinheiro, 2002).

A criopreservação de embriões tornou-se prática essencial na rotina em programas de transferência de embriões (McGinnes et al., 1993), sendo uma ferramenta valiosa para animais pecuários, pois evita perdas de germoplasma e proporciona segurança sanitária (Cógnie et al., 2003), além de auxiliar na preservação de espécies ameaçadas de extinção (Dinnyes et al., 2006). Sendo assim, a criopreservação de embriões é uma etapa crucial para a perpetuação e conservação do material genético animal (Pereira & Marques, 2008).

O efeito da criopreservação de embriões mamíferos leva a uma diminuição nos níveis de sobrevivência em comparação aos embriões frescos, principalmente quando são submetidos a esse procedimento em estágios iniciais de desenvolvimento, mostrando alta criossensibilidade (Garcia-Garcia et al., 2006). Durante o processo de criopreservação, embriões sofrem consideráveis danos morfológicos e funcionais, contudo, a extensão da

crioinjúria, bem como a taxa de sobrevivência e de desenvolvimento após o reaquecimento, são altamente variáveis dependendo da espécie, estágio de desenvolvimento e origem embrionária (Pereira & Marques, 2008).

A maioria dos embriões mamíferos é congelada pelos métodos convencionais, utilizando baixas concentrações de crioprotetores, com lenta permeabilidade e resfriamento controlado por equipamento de congelação programável (Vajta & Nagy, 2006). A vitrificação vem como alternativa que dispensa a utilização de equipamentos programáveis (Ali & Shelton, 1993a), proporciona rapidez e menor tempo de exposição ao crioprotetor, além de prevenir a formação de cristais de gelo pelo uso de altas concentrações do crioprotetor e elevados índices de resfriamento e aquecimento. Porém, esta técnica implica na exposição do embrião a maiores concentrações de crioprotetores, aumentando a possibilidade de estresse osmótico e toxicidade química (Papadopoulos et al., 2002).

Para avaliar a viabilidade de embriões produzidos *in vitro* ou obtidos de doadoras superovuladas (*in vivo*), antes de sua implantação em receptoras, estes são submetidos à análise morfológica em estereomicroscópio. No entanto, estudos recentes com microscopia eletrônica de transmissão vêm mostrando que anormalidades ultraestruturais estão presentes em embriões que se mostraram aparentemente viáveis à estereomicroscopia (Abe et al., 2002; Cocero et al., 2002; Cuello et al., 2007).

Apesar de já existirem trabalhos de criopreservação de embriões ovinos, inclusive com transferência em receptoras e taxas de prenhez, os resultados dos diferentes grupos de pesquisa ainda são contraditórios. Isto ressalta a importância de maiores estudos, com controle criterioso das variáveis envolvidas. Diante disso, tornam-se necessários mais estudos sobre a qualidade destes embriões, bem como a comparação dos métodos de congelação lenta e vitrificação.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Descrever as características ultraestruturais, organização do citoesqueleto e padrão de atividade mitocondrial de embriões ovinos produzidos *in vivo* após congelação lenta ou vitrificação.

1.1.2 Específicos

- Descrever as características ultraestruturais de embriões ovinos produzidos *in vivo*;
- Avaliar a organização do citoesqueleto de embriões ovinos produzidos *in vivo*;
- Determinar o padrão de atividade mitocondrial de embriões ovinos produzidos *in vivo*;
- Avaliar a ultraestrutural de embriões ovinos após congelação lenta ou vitrificação;
- Avaliar o citoesqueleto e o padrão de atividade mitocondrial de embriões ovinos após congelação lenta ou vitrificação;
- Verificar a eficiência da estereomicroscopia para avaliação de embriões ovinos criopreservados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Princípios Criobiológicos e Crioprotetores

O princípio fundamental no processo de criopreservação é baseado na necessidade de remoção máxima de água intracelular antes da criopreservação, para que não se tenha a formação de grandes cristais de gelo e danos celulares, possibilitando a retomada do metabolismo celular após seu armazenamento em baixas temperaturas (Vajta & Kuwayama, 2006).

Durante a congelação, a temperatura declina, a água do meio se cristaliza antecipadamente, levando ao aumento da concentração de solutos extracelulares. Assim, quando a velocidade de congelação é lenta, a célula sofre desidratação. À medida que a velocidade de congelação aumenta, o índice de sobrevivência celular também aumenta, até que seja alcançada uma relação ideal em que o índice de sobrevivência será máximo. Posteriormente, este índice declina, formando uma parábola (Mazur, 1984). Isso porque quando essa velocidade é rápida, a célula não perde água o suficiente, ocorrendo formação de gelo intracelular, que promove danos mecânicos, podendo levar à morte celular (England, 1993; Reichenbach et al., 2002).

Alterações celulares referentes à formação de cristais de gelo foram primeiramente relatadas por Mazur em 1963, que mostrou que a velocidade de saída da água intracelular está diretamente relacionada com o aumento da concentração do soluto extracelular, determinando o equilíbrio osmótico. Assim, a velocidade de congelação

determinará o grau de retração celular e a presença ou ausência de cristais de gelo (Mazur, 1984).

A variação de tempo de congelação é um fator importante no que se refere à formação e crescimento dos cristais de gelo durante a congelação celular, podendo ser expresso como “lento”, “moderado”, “rápido” e “ultra-rápido” (Leibo, 2008). Lento a moderado são índices altamente controlados até atingir temperaturas de -35 a -80°C, seguido pelo mergulho em nitrogênio líquido. Já uma queda de temperatura rápida ou ultra-rápida ocorre ao redor de 200°C/min ou acima de 20.000-100.000°C/min, respectivamente (Vajta & Nagy, 2006).

Quando a 0°C em pressão atmosférica, a água pura encontra-se parcialmente congelada, sendo este seu ponto de equilíbrio de congelação, em que cristais de gelo e água coexistem em equilíbrio e de forma homogênea (nucleação homogênea). Uma vez que a cristalização é iniciada, ocorre liberação de energia em forma de calor (calor latente de fusão), o que aumenta a temperatura necessária para atingir o ponto de equilíbrio de congelação (0°C) e quase toda a água líquida é convertida em gelo. A adição de solutos à água faz com que sua temperatura de congelação se torne mais baixa, retardando o aparecimento de cristais. Sob altas temperaturas, as moléculas dos solutos competem com as do solvente na fase em que há líquido e vapor, impedindo que as moléculas do solvente evaporem. Desta mesma maneira, as moléculas do soluto irão interferir no acesso do solvente à superfície de cristais de gelo, diminuindo a temperatura que ocorre o equilíbrio de congelação para uma temperatura inferior a 0°C. Tendo em vista que materiais biológicos possuem diversos solutos e sais intra e extracelulares, seu ponto de fusão é menor que o da água pura, o que diminui o intervalo de temperatura crítica para atingir seu ponto de equilíbrio de congelação. À medida que o solvente progride para a congelação, há aumento da concentração dos solutos na porção líquida remanescente, alterando a osmolaridade intra e extracelular (Karow, 2001).

Para que se tenha o aumento da viscosidade da solução e maior equilíbrio osmótico entre solução e material biológico, são adicionados crioprotetores. Estas substâncias têm baixo peso molecular e são usadas com o intuito de minimizar efeitos nocivos às células referentes à formação de cristais de gelo e o choque osmótico. Podem permanecer no interior das células ou fora dela e são divididos em duas categorias: permeáveis e não permeáveis. Os primeiros correspondem a pequenas moléculas que penetram pela membrana celular, formam

pontes de hidrogênio com moléculas de água intracelular e diminuem a temperatura de congelação, prevenindo a formação de cristais de gelo. Como exemplos, têm-se o propilenoglicol, glicerol, etilenoglicol (EG), dimetil sulfóxido (DMSO), entre outros (Vajta & Nagy, 2006). Os crioprotetores não permeáveis permanecem no meio extracelular, levando à desidratação do espaço intracelular por efeito osmótico (Vajta & Nagy, 2006; Pereira & Marques, 2008). São usados em combinação com os permeáveis para aumentar a concentração destes no interior das células, prevenir a formação de grandes cristais de gelo e diminuir a concentração necessária do crioprotetor permeável (Pereira & Marques, 2008).

Após a intensa utilização do glicerol como crioprotetor permeável, fez-se uso do DMSO na congelação de algumas células e tecidos (Woods et. al., 2004). Atualmente, o EG tem sido o crioprotetor mais utilizado, sendo primeiramente testado em embriões mamíferos no ano de 1977, por Miyamoto e Ishibashi, que encontraram índices de sobrevivência de embriões de ratos equivalentes ou maiores aos dos embriões criopreservados em DMSO (McGinnis et al., 1993). Estudos recentes continuam mostrando a superioridade do EG na criopreservação de embriões de diversas espécies como a bovina (Sommersfeld & Niemann, 1999; Martinez et al., 2002; Mucci et al., 2006), suína (Cuello et al., 2007; Berthelot et al., 2007), caprina (Guignot et al., 2006) e ovina (Garcia-Garcia et al., 2006; Bettencourt et al., 2009a, b).

Os índices de reaquecimento também irão influenciar a viabilidade celular e dependem das condições em que foi realizada a criopreservação. O resultado obtido do processo de descongelação depende tanto do índice de reaquecimento quanto da re-hidratação celular e remoção do crioprotetor, momento este em que o espécime já se encontra em temperatura fisiológica (Woods et. al., 2004). Ao submeter a amostra criopreservada à temperatura de reaquecimento, pode ocorrer a formação de grandes cristais de gelo pelo crescimento dos pequenos núcleos de cristais, normalmente formados durante a criopreservação, o que resulta em dano celular decorrente da recristalização (Brockbank et al., 2001). Assim como os eventos da criopreservação, na descongelação ocorre o fluxo de água e crioprotetor através da membrana celular. A mudança dinâmica do volume celular é um importante fator relacionado à possibilidade de dano mecânico decorrente do estiramento e ruptura de membrana (Woods et. al., 2004).

Solutos impermeáveis como os açúcares oferecem meios de diluição adicional para que seja prevenida a excessiva turgidez osmótica da célula durante a remoção do crioprotetor na descongelação (Woods et. al., 2004). Por isso são usadas altas concentrações de crioprotetores não permeáveis nesta fase, sendo que o mais comum é a sacarose, mas outros dissacarídeos como a galactose e a trealose podem ser utilizados (Pereira & Marques, 2008). Apesar de existirem diferentes polímeros para este fim, como polivinilpirrolidona, polietilenoglicol, ficoll, dextran e álcool polivinílico, somente o ficoll vem sendo utilizado, geralmente em associação com EG e sacarose (Woods et. al., 2004).

O mecanismo de defesa celular para sobreviver a condições não fisiológicas é inapropriado e requer suporte externo. Injúrias decorrentes do resfriamento podem ocorrer em todas as fases do procedimento de criopreservação. Contudo, o maior entendimento das causas, mecanismos destes danos e sua eventual recuperação levarão ao desenvolvimento de métodos de criopreservação mais eficientes, que evitariam injúrias letais ou irreversíveis (Vajta & Nagy, 2006).

2.2 Eficiência da Criopreservação e Principais Crioinjúrias

Embriões sofrem consideráveis danos durante a criopreservação. A formação de cristais de gelo, a toxicidade da solução crioprotetora e o choque osmótico correspondem aos maiores efeitos adversos do crioprocédimento. A extensão da injúria depende de fatores que incluem: tamanho e forma das células, permeabilidade de membrana e sensibilidade dos embriões (Vajta & Kuwayama, 2006). A sensibilidade ao resfriamento também é dependente da espécie, condições em que foi desenvolvido (*in vivo/in vitro*) e estágio de desenvolvimento embrionário (Leibo & Devereddy, 2007).

Embriões suínos produzidos *in vivo* ou *in vitro* (PIV) e embriões bovinos PIV são bastante sensíveis a temperaturas abaixo de 14°C. Já embriões bovinos e ovinos produzidos *in vivo* apresentam maior tolerância (Pollard & Leibo, 1994). O aumento considerável da criossensibilidade de embriões PIV está relacionado aos diferentes níveis lipídicos e proteicos (George & Seidel, 2006). O maior conteúdo lipídico e menor massa celular interna são características de embriões PIV atribuídas ao ambiente inapropriado de cultivo (Massip, 2001).

Independente da origem, embriões em estágio de blastocisto tendem a ser mais resistentes à criopreservação, quando comparado a estágios iniciais de clivagem e mórulas. Esta maior tolerância é observada tanto na congelação lenta quanto na vitrificação (Martinez & Matkovic, 1997; Garcia-Garcia, et al., 2005).

A perda de água intracelular dependerá de sua permeabilidade, determinada pela composição e área da membrana celular. Também é influenciada pela temperatura de exposição e pela pressão encontrada entre o meio extra e intracelular. Os crioprotetores diferem entre si quanto à permeabilidade celular, sendo que diferentes estágios de desenvolvimento embrionário influenciarão a permeabilidade do mesmo crioprotetor. Além disso, embriões em mesmo estágio, mas de diferentes espécies, terão diferenças na permeabilidade de um mesmo crioprotetor (Leibo, 2008).

Temperaturas abaixo da temperatura corporal fisiológica, mas acima de 0°C, são definidas como “zona de perigo” e acarretam injúrias do resfriamento. Estas injúrias foram primeiramente descritas na década de 30 em gametas femininos e tidas como danos irreversíveis desenvolvidos no processo de resfriamento a temperaturas acima de 0°C (Zeron et. al., 1999). As membranas celulares são danificadas devido à fase de transição da membrana lipídica, período durante o resfriamento em que se têm alterações estruturais e funcionais desta membrana (Yavin & Arav, 2007).

Vajta & Nagy (2006) postulam que temperaturas entre 15 e -5°C estão relacionadas a danos de gotas lipídicas citoplasmáticas e microtúbulos. Injúrias de microtúbulos são tidas como reversíveis, contudo, prejuízos às gotas lipídicas não, contribuindo para a morte de embriões criopreservados. Estes autores afirmam que entre -5 a -80°C corresponde à principal fase de injúrias por cristais de gelo, enquanto que em temperaturas entre -50 e -150°C podem ocorrer fraturas de zona pelúcida ou danos no citoplasma, porém a temperatura de risco e o mecanismo pelo qual esta injúria ocorre não estão definidos. Temperaturas abaixo de -150°C é a fase de menor injúria, sendo o aquecimento acidental a forma mais provável de causar danos.

Além desses processos, existem injúrias parcialmente compreendidas, incluindo danos a organelas citoplasmáticas, citoesqueleto e regiões intercelulares (Vajta & Nagy, 2006). Crioprotetores permeáveis interagem a nível intracelular influenciando a

dinâmica dos microfilamentos e microtúbulos. Estes respondem de forma variável e esta variação é relacionada ao estágio de desenvolvimento embrionário (Dobrinsky, 1996).

O citoesqueleto corresponde a uma estrutura que se reorganiza constantemente, controlando a forma celular, transporte de organelas, segregação de cromossomos e divisão celular. Esta estrutura é mais suscetível a danos quando os embriões estão em fase de compactação e formação da blastocele, pois é quando a diferenciação celular e organização do citoesqueleto se tornam mais complexas (Dobrinsky, 1996).

Através de estudos ultraestruturais foi possível verificar graves alterações celulares em embriões criopreservados classificados em estereomicroscópio como sendo de grau I ou II de qualidade (Cocero et al., 2002; Abe et al., 2002; Cuello et al., 2007; Bettencourt et al., 2009a). Dentre estas alterações observadas ao microscópio eletrônico de transmissão estão a presença de numerosos vacúolos, vesículas e gotas lipídicas, células de tamanhos irregulares, debris celulares no espaço perivitelínico ou blastocele e alteração no número de microvilosidades apicais (Cocero et al., 2002).

De modo geral, todos os embriões sofrem consideráveis danos durante o processo de criopreservação e aquecimento. Contudo, suas células possuem notável capacidade de reparar parcial ou totalmente estes danos, tornando possível continuar seu desenvolvimento normal. Logo, a proposta dos procedimentos de criopreservação é de minimizar os danos e contribuir para que ocorra esta regeneração (Vajta & Nagy, 2006). Estratégias para driblar estas injúrias incluem a redução do volume criopreservado, modificação da relação superfície celular/volume e melhora da criotolerância pela suplementação com vários aditivos, como estabilizadores do citoesqueleto (Pereira & Marques, 2008).

2.3 Congelação Lenta de Embriões

Também conhecida como método de congelação clássica, tradicional ou de equilíbrio, a congelação lenta vem sendo usada desde 1971, quando foi desenvolvida por Whittingham. A partir de então, esta técnica foi padronizada e largamente utilizada no âmbito comercial e industrial. Este método pode ser interpretado como uma tentativa de criar um delicado balanço entre vários fatores que levariam a formação de cristais de gelo, fraturas,

danos tóxicos e osmóticos, permitindo trocas entre os meios extra e intracelular sem que ocorram sérios efeitos osmóticos e deformidades celulares. Apesar das concentrações dos crioprotetores serem perigosamente altas em sua fase final de congelação, isto acontece em baixas temperaturas, onde o efeito tóxico é mínimo (Vajta & Kuwayama, 2006).

A congelação lenta consiste de um pré-equilíbrio e exposição dos embriões à solução crioprotetora para então serem submetidos à queda de temperatura em máquina programável. Em uma primeira etapa a temperatura atinge uma fase de pré-congelação à -7°C , momento em que ocorreria a liberação do calor latente de fusão e um prejudicial aumento da temperatura, que é evitado pelo *seeding*, através do contato da palheta com um objeto metálico pré-resfriado em nitrogênio líquido. Após sua manutenção em um período de equilíbrio de 10 a 15 minutos, os embriões são congelados lentamente com queda de temperatura entre 0,3 e $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, até atingir -30 a -35°C . Neste momento tem-se a formação de gelo extracelular da água pura e conseqüente aumento da concentração do soluto extracelular, o que leva à desidratação da célula por osmose. Ao se encontrar suficientemente desidratada, a célula terá uma alta concentração de solutos capaz de impedir a cristalização do gelo neste momento em que ocorre sua imersão em nitrogênio líquido (Vajta & Nagy, 2006).

O processo de descongelação necessita de um rápido aquecimento para impedir que pequenos cristais de gelo, não prejudiciais às células, fundam-se e cresçam, tornando-se danosos. Após o aquecimento, os crioprotetores são removidos através da passagem do material biológico em soluções com concentração decrescente de crioprotetores impermeáveis (Woods et. al., 2004). Quando o espécime é exposto a estas soluções, o conteúdo intracelular do crioprotetor diminui gradativamente na presença do açúcar e o embrião é reidratado na solução de manutenção (Rall, 1992).

O método de congelação lenta não é somente um processo longo, mas também requer um dispendioso aparato de equipamentos de congelação e grande volume de nitrogênio líquido. Apesar de possuir reconhecidas limitações quanto à prevenção na formação de cristais de gelo intracelular, esta técnica tornou-se altamente padronizada com considerável aplicação comercial e industrial. Por oferecer parâmetros precisos e meios comerciais prontos para utilização na congelação e descongelação, sua realização é possível após um curto período de treinamento (Vajta & Nagy, 2006).

2.4 Vitriificação de Embriões

A vitriificação foi primeiramente introduzida na criopreservação de embriões de camundongos por Rall & Fahy (1985). Em anos subsequentes foram publicados diversos trabalhos com oócitos e embriões de diversas espécies, explorando possibilidades de combinações, adição e remoção de crioprotetores, além de novos métodos e formas de armazenamento (Vajta & Kuwayama, 2006).

Esta técnica pode ser considerada como um método de criopreservação em que a formação de cristais de gelo é totalmente eliminada. Nela, a solidificação é atingida pelo aumento extremo da viscosidade e não pela cristalização, atingindo diretamente a fase vítrea (Massip, 2001; Yavin & Arav, 2007). Permite a passagem pela zona crítica de temperatura de maneira rápida, o que impede o desenvolvimento de injúrias ocasionadas pela formação dos cristais de gelo. Contudo, a concentração do crioprotetor necessária, em torno de 40% da solução, traz efeitos tóxicos e hipertônicos para o espécime (Massip, 2001), e aumenta o risco de injúrias causadas pelo choque osmótico e toxicidade celular (Wusteman et al., 2004; Vajta & Nagy, 2006). As consequências são alterações de microvilosidades nas células do trofotoderma, perda da integridade de membrana, alterações mitocondriais e de retículo endoplasmático rugoso, formação de vesículas e agregados de partículas entre as membranas celulares (Bittencourt et al., 2009a).

A probabilidade de sucesso na vitriificação está ligada a três fatores: viscosidade da amostra, índices de resfriamento-aquecimento e volume da amostra. Estes fatores são independentes e os dois primeiros estão relacionados direta e positivamente à probabilidade de vitriificação, isto é, quanto maior a viscosidade e índice de resfriamento, maior será a chance de vitriificação. Porém, o volume da amostra tem relação inversa e a sua diminuição leva ao aumento da probabilidade de vitriificação (Yavin & Arav, 2007).

Diferentes ferramentas já foram utilizadas para que o volume da amostra a ser vitrificada fosse diminuído (mínimo volume “congelado”). Dentre elas estão as grades de microscopia eletrônica (Martino et al., 1996), *Open Pulled Straws* (OPS) (Vajta et al., 1998), micropipetas de vidro (Kong et al., 2000) *crioloops* (Fuchinoue et al., 2004) e *criotops* (Kuwayama, 2007).

As palhetas de 0,25mL, inicialmente utilizadas na vitrificação, foram rapidamente substituídas pela OPS, que possui metade do diâmetro em sua porção final, possibilitando o uso de menor volume para a vitrificação e o envase do embrião por capilaridade (Vajta & Nagy, 2006). Outra alternativa é a micropipeta de vidro que, após seu aquecimento e estiramento, passou a ter aplicação semelhante à OPS, porém com maior fragilidade no armazenamento pelo risco de quebra (Kong et al., 2000).

Na busca de volumes ainda menores, diversos métodos já foram testados no intuito de maximizar a taxa de resfriamento. O método de *Crioloop* consiste na utilização de um fio de nylon para a formação de um aro e acomodação do embrião com o meio no círculo formado. Diretamente imerso em nitrogênio líquido, proporciona índice de resfriamento de 700.000°C/min (Lane et al., 1999). Dentro do mesmo princípio, a técnica de *Criotop* é realizada com o uso de uma haste que, posteriormente à vitrificação, é protegida por um cilindro plástico para evitar danos mecânicos no armazenamento. Em sua porção final é acondicionado o embrião, com o mínimo de meio possível (menos de 0,1µL) e queda de temperatura de até 40.000°C/min (Kuwayama, 2007).

A redução da pressão do ambiente pela formação de vácuo diminui o ponto de ebulição do nitrogênio de -196°C para -200 a -205°C e aumenta o índice de resfriamento por possibilitar maior eficiência na troca de calor durante a imersão da amostra em nitrogênio líquido (Vajta & Kuwayama, 2006). Em condições de pressão atmosférica normal, é formada uma bolsa de vapor ao redor da amostra, diminuindo a troca de calor e a eficiência do nitrogênio líquido em resfriar o espécime (Yavin & Arav, 2007). Já a vitrificação em superfície sólida elimina totalmente a formação do vapor ao redor da amostra e consiste no contato da solução com o espécime sobre uma superfície metálica resfriada com nitrogênio líquido (Vajta & Kuwayama, 2006).

Durante o aquecimento de embriões vitrificados, pode haver a formação de cristais de gelo intracelular, processo conhecido como desvitrificação. Isso ocorre em situações em que a concentração do crioprotetor permeável é insuficiente. Essa concentração deve ser superior a 20%, porém limitada, para diminuir os danos decorrentes do efeito tóxico da solução (Jin et al., 2008).

O risco na transmissão de doenças pelo contato direto com nitrogênio líquido e a impossibilidade da transferência direta de embriões vitrificados foram inconvenientes

iniciais que dificultaram a prática da vitrificação. Porém, soluções práticas que driblaram estes problemas foram encontradas e estão sendo aplicadas com sucesso (Kuwayama et al., 2005; Vajta & Nagy, 2006).

A possibilidade de acondicionar a OPS em palhetas de 0,5 mL previamente resfriadas (Kuwayama, 2007) e a possibilidade do uso de nitrogênio líquido filtrado e esterilizado ou ainda o armazenamento da amostra em containeres hermeticamente fechados elimina a possibilidade do contato entre o espécime e possíveis contaminantes (Vajta et al., 1998). Já a transferência direta de embriões vitrificados é possível por meio da palheta de 0,25 mL preparada com duas colunas de uma solução de sacarose, onde o embrião, pré-aquecido em ar, é depositado através do contato da porção final da OPS, já que o embrião desce por capilaridade para o meio com sacarose presente na palheta. A possibilidade de utilização da transferência direta de embriões vitrificados, sem uma prévia avaliação da sua qualidade, diminui a taxa de não aproveitamento de embriões que seriam descartados, porém, capazes de estabelecer prenhez (Baril et al., 2001; Isachenko et al., 2003).

De modo geral, a vitrificação requer o estabelecimento de um sistema seguro de resfriamento e minimização ou eliminação dos efeitos nocivos dos crioprotetores. Contudo, índices estatísticos de desenvolvimento embrionário mostram que os efeitos deletérios tóxicos e osmóticos da vitrificação não são superiores aos causados pela congelação lenta (Kuwayama, 2007).

2.5 Criopreservação de Embriões Ovinos

Após o primeiro nascimento de embriões congelados descrito por Whittingham em 1971 com embriões de ratos, esta técnica foi aplicada para outras espécies de mamíferos, incluindo a ovina em 1974, por Willadsen e colaboradores. Já a vitrificação foi sugerida pela primeira vez por Lunet no ano de 1937 (citado por Ali & Shelton, 1993b), porém, sua aplicação maior em pesquisas foi iniciada por Rall e Fahy em 1985. A partir daí, esta técnica de criopreservação vem sendo amplamente pesquisada em diversas espécies (Vajta et al., 1998: bovina; Berthelot et al., 2007: suína; Skidmore et al., 2009: camelídea; El-Gayar & Holtz, 2001; Guignot et al., 2006: caprina; Martinez & Matkovic, 1997; Baril et al., 2001; Papadopoulos et al., 2002; Dattena et al., 2004; Bettencourt et al., 2009b: ovina).

Assim como nas demais espécies que utilizam a criopreservação de embriões para fins comerciais ou de pesquisa, na espécie ovina os métodos comumente utilizados para a criopreservação de embriões são a congelação lenta ou clássica e a vitrificação. Contudo, a prática de colheita de embriões ovinos, seguida da criopreservação, é feita em menor escala, quando comparada a de bovinos (Isachenko et al., 2003). Esse menor uso da prática na transferência de embriões (TE) em ovinos está relacionado ao alto custo da técnica comparado ao valor do animal. Portanto, a redução deste custo em algum dos estágios da TE traria benefícios à prática de melhoramento genético ovino (Baril et al., 2001).

Apesar de alterações morfológicas e funcionais ocorrerem frequentemente após a criopreservação, embriões da espécie ovina, juntamente com a dos bovinos, são tidos como os de maior criotolerância em comparação aos embriões de suínos e equínos (Pereira & Marques, 2008), porém os índices de sobrevivência embrionária e prenhez em ovinos são conflitantes, conferindo grande variação e pouco conhecimento sobre os pontos críticos do processo de criopreservação, bem como suas consequências ultraestruturais.

Cocero et al. (1996) mostraram que o EG é mais eficiente para criopreservar embriões ovinos que o glicerol. Além disso, embriões em estágio de blastocistos apresentam maior índice de sobrevivência do que mórulas (70,5% versus 57,9%). A maior criotolerância de blastocistos comparada a de embriões em estágios mais iniciais de desenvolvimento (2-12 células) foi mostrada por Garcia-Garcia et al. (2006), mesmo quando estes embriões foram cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto antes da criopreservação (Garcia-Garcia et al., 2005). As melhores taxas de sobrevivência de blastocistos ovinos criopreservados em EG variam entre 70,5% a 83,7% (McGinnis et al., 1993; Cocero et al., 1996; Garcia-Garcia et al., 2005; Garcia-Garcia et al., 2006).

Após mostrar a superioridade do EG na congelação lenta de embriões ovinos produzidos *in vivo*, Martinez & Matkovic (1997) compararam diferentes crioprotetores na vitrificação (propilenoglicol e glicerol versus EG, Ficoll e sacarose). Contudo, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos quanto ao índice de sobrevivência embrionária e prenhez. Já Bettencourt et al. (2009b) compararam taxas de prenhez após criopreservação por congelação lenta em EG, vitrificação em palhetas de 0,25mL (glicerol e EG) ou em OPS (EG e DMSO). Neste estudo não foi observada diferença significativa entre

os métodos de criopreservação, sendo que as taxas de prenhez aos 45 dias foram de 68,4%, 50% e 54,6%, respectivamente.

Embriões ovinos produzidos *in vivo* ou *in vitro* variam grandemente quanto sua viabilidade após criopreservação. Dattena et al. (2000), utilizando blastocistos produzidos *in vitro* ou *in vivo*, após vitrificação com EG e glicerol, tiveram índices de sobrevivência embrionária de 67% para blastocistos PIV e 84% aos produzidos *in vivo*. Contudo, ao comparar a vitrificação de embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo*, Dattena et al. (2004) não encontraram diferenças significativas entre os grupos, atingindo taxas de prenhez equivalentes a 57% versus 50%, respectivamente. Já Papadopoulos et al. (2002) tiveram resultados significativamente inferiores após vitrificação de embriões ovinos produzidos *in vitro*, que foram justificados pelo protocolo de vitrificação semelhante ao aplicado nos embriões produzidos *in vivo*. Estes autores sugeriram a necessidade do desenvolvimento de protocolos de vitrificação padronizados para determinada origem, fase e espécie embrionária.

Comparando a criotolerância de embriões PIV de caprinos e ovinos, Traldi et al. (1996) mostraram que blastocistos ovinos possuem menor índice de sobrevivência que os caprinos (41% versus 60%) após a vitrificação em glicerol e EG. Após inovulação esta diferença se tornou mais acentuada, com 30% de prenhez e 45% de nascimento em caprinos, enquanto que as ovelhas alcançaram somente 9 e 15%, respectivamente. Em trabalho mais recente, Martinez et al. (2006), ao testar embriões ovinos PIV, compararam protocolos de vitrificação com diferentes crioprotetores. O protocolo de melhor taxa de eclosão foi a mistura de EG e glicerol, com 76,4%, juntamente com índice de prenhez aos 30 dias pós inovulação com 42,7%, o que não diferiu do alcançado pelo grupo de embriões PIV frescos (50%).

Outro aspecto relevante em programas de TE ovinos é a possibilidade da inovulação direta após a congelação ou vitrificação dos embriões (Baril et al., 2001; Isachenko et al., 2003; Green, 2007). Essa prática pode garantir um ganho potencial de 8% em termos de nascimentos, diminuindo as taxas de embriões descartados após o reaquecimento, que correspondem a 15-20% do total de embriões (Baril et al., 2001).

Têm sido realizadas sucessivas pesquisas no intuito de encontrar a solução crioprotetora de melhor penetrabilidade e menor toxidez, além da definição sobre a fase de menor criossensibilidade de embriões produzidos *in vitro*, *in vivo* ou cultivados, além da dinâmica osmótica que ocorre na célula embrionária durante a criopreservação (Rall, 1992;

Sommerfeld & Niemann, 1999; Garcia-Garcia et al., 2005; Garcia-Garcia et al., 2006). Porém, pesquisas voltadas para a caracterização e avaliação ultraestrutural de embriões ovinos submetidos aos diferentes métodos de criopreservação são escassas.

Mesmo classificados morfologicamente como ótimos ou bons, embriões criopreservados mostram menores índices de sobrevivência e de prenhez, quando comparados a embriões frescos de mesma qualidade (Cocero et al., 2002). Cocero et al. (2002) reportaram pela primeira vez um estudo ultraestrutural de embriões ovinos congelados com EG ou glicerol, em diferentes estágios de desenvolvimento. Foram identificados danos ultraestruturais que justificariam o desempenho inferior de mórulas quando em comparação a de blastocistos congelados em glicerol, sendo que os grupos congelados em EG mostraram menos danos, tanto das mórulas quanto dos blastocistos.

Ao comparar embriões ovinos produzidos *in vivo*, congelados ou vitrificados, Bettencourt et al (2009a) não encontraram diferenças ultraestruturais nestes embriões após uma hora da descongelação ou aquecimento. Contudo, houve maior proporção de blastocistos de grau 3 após a vitrificação e aquecimento. Porém, logo após o aquecimento os embriões vitrificados ainda se encontram colapsados, com alto grau de desorganização ultraestrutural, o que prejudicaria sua avaliação neste período. A maioria destas alterações celulares é progressivamente restaurada e quase que totalmente ausente após 24 horas de cultivo *in vitro* (Cuello et al., 2007).

Têm-se trabalhos envolvendo microscopia eletrônica de transmissão (MET) com a caracterização de embriões ovinos frescos (Ferrer et al., 1995) ou congelados em diferentes crioprotetores (Cocero et al., 2002) e comparando os principais métodos de criopreservação (Bettencourt et al., 2009a). Porém, esta linha de pesquisa torna-se falha pela ausência de trabalhos que envolvam a avaliação ultraestrutural de embriões ovinos criopreservados e sua associação a danos do citoesqueleto e padrão de atividade mitocondrial após reaquecimento.

2.6 Instrumentos para Avaliação Embrionária

2.6.1 Estereomicroscópio

Possibilitando avaliação em um aumento de até 80 vezes com o uso de um equipamento portátil, a estereomicroscopia corresponde a um método de avaliação embrionária vastamente utilizada na rotina de transferência e produção *in vitro* de embriões. Neste método é possível avaliar a aparência geral do embrião sem o uso de marcadores vitais ou necessidade de fixação e consequente morte do embrião. Com o estereomicroscópio, ou lupa, é possível mensurar tamanho e formato do embrião (Tveden-Nyborg et al., 2005), visualizar células extrusas no espaço perivitelínico ou blastocele e colorações heterogêneas dos blastômeros, células do trofoblasto ou botão embrionário. A partir destas observações é possível classificar os embriões em diferentes graus de qualidade durante o cultivo *in vitro*, para avaliação de índices de sobrevivência e eclosão ou, antes da inovulação, para mensuração de taxa de prenhez. Esta classificação em lupa varia de 1 a 4, dependendo da proporção de células extrusas, consideradas inviáveis, e heterogeneidade da coloração entre as células embrionárias, que podem caracterizar degeneração embrionária (Robertson & Nelson, 1998).

2.6.2 Microscópio óptico ou de luz

Pelo uso da microscopia de luz é possível a avaliação de embriões em um aumento de até 1000 vezes, tornando possível a determinação da aparência citoplasmática, nuclear e organização geral das células através de cortes do espécime incluído em parafina ou resina, revelando detalhes de até 0,2 μ m (Alberts et al., 2004). Contudo, para que esta avaliação interna da célula seja realizada, é necessário que este embrião não esteja mais viável, mas sim fixado para que o processamento de inclusão em resina ou parafina seja realizado. Sendo assim, este método de avaliação estrutural é apenas utilizado em trabalhos de pesquisas para se ter uma avaliação mais detalhada do interior das células embrionárias e que não objetivem a aquisição de dados referentes ao desenvolvimento após avaliação.

Para avaliação de células vivas, também se pode fazer uso do microscópio de luz, que, através da troca de seus componentes ópticos, permite a visualização de células não coradas e viáveis pela microscopia direta ou de campo claro, microscopia de contraste de fase ou microscopia de contraste interferencial (Alberts et al., 2006). Com esta ferramenta não se vê o interior das células e, no caso de embriões, é vista uma imagem semelhante ao do estereomicroscópio com um maior poder de aumento e resolução, tendo a desvantagem da impossibilidade do uso a campo pela fragilidade e menor praticidade na utilização deste instrumento de microscopia.

2.6.3 Microscópio de fluorescência e confocal

A microscopia de fluorescência faz uso de um microscópio de luz que utiliza comprimento de onda diferenciado e filtros. Este tipo de microscopia torna possível localizar estruturas intracelulares marcadas por compostos específicos que se combinam com certas substâncias presentes na estrutura celular e que fluorescem ao serem excitados por radiações de determinados comprimentos de onda, geralmente a ultravioleta. Já os filtros deixam passar somente os comprimentos de onda emitidos pelo agente fluorescente (Alberts et al., 2006). Geralmente é utilizado como método de marcação a imunofluorescência, que é feita através da exposição do espécime a um antígeno que tem afinidade a alguma substância presente na estrutura e, posteriormente é adicionado um anticorpo fluorescente específico para o antígeno anterior. Porém, um microscópio de fluorescência comum permite sobreposição das fluorescências (*background*) e conseqüente prejuízo da nitidez da imagem formada (Alberts et al., 2004).

Pela microscopia confocal de fluorescência por varredura a laser (microscopia confocal) também é possível identificar estruturas marcadas com fluorocromos associados ou não a anticorpos, porém com maior nitidez. Este microscópio permite avaliar planos focais restritos bem definidos através de vários artifícios, dentre eles o *pinhole*. Esta estrutura do microscópio confocal possibilita filtrar os raios emitidos por partes da amostra que não estão sendo focalizadas, resultando em maior nitidez, mesmo na visualização tridimensional da amostra. Logo, é possível obter informações de organização e distribuição de citoesqueleto, organelas, metabólitos celulares e também identificar núcleos normais ou com

desfragmentação de cromatina presente em processos de morte celular (Alberts et al., 2004). No processamento o embrião pode ser marcado ainda vivo, com corantes vitais ou marcadores de organelas ativas, ou após a fixação. No entanto, o embrião marcado, mesmo ainda vivo, pode se tornar impróprio para avaliação de seu posterior desenvolvimento ou inovulação, pois é sabido que a exposição à luz ultravioleta provoca alterações citoplasmáticas e de membranas em poucos segundos de exposição (Smith, 1993).

2.6.4 Microscópio eletrônico de transmissão

Avaliações referentes à aparência e organização das organelas e membranas celulares não são possíveis com o uso de estereomicroscópio e microscopia de luz, sendo somente visualizadas com o uso da microscopia eletrônica de transmissão (Cuello et al., 2007). Ela proporciona um aumento de até um milhão de vezes, tornando possível visualizar detalhes com até 2nm e determinação de alterações impossíveis de serem reconhecidas em qualquer outro método de avaliação (Alberts et al., 2006). Apesar de seu alto poder de aumento e potencial de resolução, para a avaliação no microscópio eletrônico de transmissão é necessário também a fixação do espécime para inclusão em resina e realização de cortes do material, impossibilitando o uso do embrião vivo após a análise.

Mesmo com o aumento da precisão e poder de resolução dos métodos de avaliação da qualidade embrionária, o uso do estereomicroscópio é essencial na rotina de classificação dos embriões, pois poucos são os métodos que garantem a viabilidade celular mesmo após a avaliação como no caso da lupa, que se mostra eficaz e prática. No entanto, essa ferramenta vem se mostrando um tanto subjetiva, pois mesmo embriões considerados de qualidade excelente ou boa na estereomicroscopia falham no estabelecimento da prenhez. Além disso, alguns estudos já mostraram também que estes mesmos embriões podem apresentar diferentes danos subcelulares quando avaliados por outros métodos (Cuello et al., 2005; Cuello et al., 2007; Bettencourt et al., 2009a). Desta forma, uma relação bem estabelecida entre os diferentes métodos de avaliação e o conhecimento das alterações subcelulares causadas por técnicas de reprodução tornam-se necessários.

CAPÍTULO 2

Estrutura do citoesqueleto, padrão de atividade mitocondrial e ultraestrutura de embriões ovinos congelados ou vitrificados

**ESTRUTURA DO CITOESQUELETO, PADRÃO DE ATIVIDADE
MITOCONDRIAL E ULTRAESTRUTURA DE EMBRIÕES OVINOS
CONGELADOS OU VITRIFICADOS**

Luciana Dalcin¹, Carolina Madeira Lucci²

¹Universidade de Brasília, ²Profa. Dra. Universidade de Brasília

RESUMO

A criopreservação de embriões ovinos tem sido amplamente difundida, porém seus índices de sobrevivência e prenhez têm mostrado grande variação. Neste estudo, embriões produzidos *in vivo* foram congelados ou vitrificados e reaquecidos para avaliação ultraestrutural e determinação do padrão de atividade mitocondrial e integridade do citoesqueleto. Os embriões foram colhidos de ovelhas superovuladas, classificados e selecionados para criopreservação. Embriões submetidos à congelação lenta (n=22) foram expostos à solução de 0,75M de etilenoglicol (EG) por 10 minutos, 1,5M de EG por 10 minutos, acondicionados em palhetas de 0,25mL e submetidos a curva de congelação programável (-1°C/min, *seeding* a -7°C, 0,3°C/min até -35°C) com posterior imersão em nitrogênio líquido. Embriões vitrificados (n=24) foram submetidos à solução de 10% de EG+10% de DMSO por 1 minuto e 30 segundos, passando para a solução de 20% de EG+20% de DMSO com 0,5M de sacarose por 30 segundos acondicionados em OPS e mergulhados em nitrogênio líquido. Os embriões descongelados/reaquecidos foram cultivados por 1 hora, reclassificados em estereomicroscópio e subdivididos para avaliação. Os embriões criopreservados mostraram variável grau de desorganização de citoesqueleto e ausência de marcação para atividade mitocondrial. Foi possível correlacionar os achados anteriores com a ultraestrutura e distribuição das organelas pelo citoplasma. Embriões congelados mostraram características ultraestruturais semelhantes a embriões frescos de mesma qualidade. Embriões vitrificados apresentaram maior frequência de grandes vesículas de digestão.

Palavras chave: congelação lenta, vitrificação, microscopia eletrônica de transmissão, confocal, organelas.

CYTOSKELETON STRUCTURE, PATTERN OF MITOCHONDRIAL ACTIVITY AND ULTRASTRUCTURE OF FROZEN OR VITRIFIED SHEEP EMBRYOS

Luciana Dalcin¹, Carolina Madeira Lucci²

¹Universidade de Brasília, ²Profa. Dra. Universidade de Brasília

ABSTRACT

Cryopreservation of sheep embryos has been widespread, but their survival rate and pregnancy have shown great variation. After in vivo production sheep embryos were frozen or vitrified and processed for ultrastructural evaluation and determining the pattern of mitochondrial activity and integrity of the cytoskeleton. Embryos were collected from superovulated ewes, classified and selected for cryopreservation. Embryos subjected to slow freezing (n = 22) were exposed to 0.75 M ethylene glycol (EG) for 10 minutes, 1.5M EG for 10 minutes, packed in 0.25mL straws and subjected to programmable freezing (-1 ° C / min, seeding at -7 ° C, 0.3 ° C / min to -35 ° C) followed by immersion in liquid nitrogen. Vitrified embryos (n = 24) were placed in 10% EG +10% DMSO solution for 1 minute and 30 seconds, then in 20% EG +20% DMSO solution with 0,5M sucrose for 30 seconds packed in OPS and dipped in liquid nitrogen. The cryopreserved embryos were warmed, cultured for 1 hour, reclassified and subdivided for evaluation. Cryopreserved embryos showed variable degree of cytoskeleton disorganization and no marker for mitochondrial activity. It was possible to correlate these findings with the ultrastructure and distribution of the organelles. Frozen embryos showed ultrastructural features similar to fresh embryos of the same quality. Vitrified embryos showed a higher frequency of large digestion vesicles.

Keywords: slow freezing, vitrification, transmission electron microscopy, confocal, organelles

1 INTRODUÇÃO

Por possibilitar maior segurança sanitária e preservação de germoplasmas por longos períodos, a criopreservação de embriões tornou-se essencial na rotina de programas de transferência de embriões (Dinnyes et al., 2006). Como desvantagem deste processo, tem-se a ocorrência de consideráveis danos morfológicos e funcionais. Contudo, a extensão destas crioinjúrias, bem como a taxa de sobrevivência e desenvolvimento após o reaquecimento são altamente variáveis dependendo da espécie, estágio de desenvolvimento e origem embrionária (Pereira & Marques, 2008).

A colheita de embriões ovinos seguida da criopreservação, apesar de ainda ser significativamente menor do que a realizada na espécie bovina, tem tido grande importância à medida que a ovinocultura cresce (Isachenko et al., 2003). No entanto, o alto custo da técnica comparado ao valor do animal corresponde a um fator limitante. Assim, a redução de custos e/ou o aumento da eficácia da criopreservação trariam grandes benefícios à atividade de melhoramento genético ovino (Bettencourt et al., 2009b).

A congelação lenta tem sido o método mais utilizado na criopreservação de embriões mamíferos. Contudo, necessita de máquina de congelação programável e grande quantidade de nitrogênio líquido, fatores que aumentam o custo da transferência desses embriões. A vitrificação vem tendo crescente utilização com fins comerciais e de pesquisa. Por corresponder uma técnica de criopreservação que não utiliza máquina de congelação programável, possibilita diminuir custos em programas de transferência de embriões criopreservados (Vajta & Nagy, 2006). Porém, estudos comparando estas duas técnicas são

escassos para a espécie ovina, principalmente quando se trata dos efeitos subcelulares nos embriões.

Os índices de sobrevivência com a utilização de embriões ovinos produzidos *in vivo* criopreservados são inconstantes. Estes índices variam desde 4,2 e 57,9% após congelação lenta de mórulas em glicerol e EG, respectivamente (Cocero et al., 1996), até 83,7% pela congelação de blastocistos em EG (Garcia-Garcia et al., 2005). A vitrificação desses embriões também tem mostrado variações significativas em seus resultados. Enquanto são obtidas taxas de sobrevivência embrionária próximas de 60 a 70% após o aquecimento em alguns estudos (Dattena et al., 2000; Baril et al., 2001; Isachenko et al., 2003), outros atingem índices pouco superiores a 30 ou 50% (Papadopoulos et al., 2002; Green, 2007; Bettencourt et al., 2009b).

Um único trabalho (Bettencourt et al., 2009a) compara os métodos de congelação lenta e vitrificação em embriões ovinos e descreve achados ultraestruturais. Porém, não há relatos sobre estrutura do citoesqueleto e atividade mitocondrial após tais procedimentos. Além disso, alguns autores (Cocero et al., 2002; Cuello et al., 2005 e 2007) questionam a eficácia do estereomicroscópio na avaliação embrionária após criopreservação ao apontar alterações celulares vistas somente por outros métodos de avaliação.

Diante disso, tornam-se necessários mais estudos sobre a eficácia da estereomicroscopia para avaliar a qualidade destes embriões, bem como a comparação dos métodos de congelação lenta e vitrificação. Este trabalho tem por objetivo descrever as características ultraestruturais, organização do citoesqueleto e padrão de atividade mitocondrial de embriões ovinos produzidos *in vivo* após congelação lenta ou vitrificação, e verificar a eficácia da lupa para a avaliação dos embriões criopreservados.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos Embriões

Os embriões foram colhidos de 30 ovelhas da raça Santa Inês superovuladas. O protocolo hormonal incluiu o uso de esponja intravaginal (60mg de acetato de medroxiprogesterona-MAP, Progespon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) durante 14 dias. No sétimo dia a esponja foi substituída por uma nova e aplicado 0,14mg de D-Cloprostenol (Prolise®, ARSA S.R.L, Buenos Aires, Argentina). No 12º dia foi iniciada a superovulação com aplicações de Hormônio Folículo Estimulante (FSH, Folltropin-V®, Bioniche, Ontário, Canadá) em doses decrescentes, duas vezes ao dia, por quatro dias, iniciando com 40mg e finalizando com dose de 10mg, totalizando 200mg por animal. No momento da retirada da esponja intravaginal foi aplicado, em dose única, 200UI de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG, Novormon®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) e, após 48 e 56 horas, foram realizadas duas inseminações artificiais por laparoscopia com sêmen fresco. Passados 5 a 7 dias após a inseminação, foi realizada laparoscopia para comprovação da resposta ovariana à superovulação para posterior anestesia (0,1mg/kg de cloridrato de xilazina 2%, Xilazin®, Syntec, São Paulo, Brasil e 1,16mg/kg de cloridrato de quetamina 10%, Cetamin®, Syntec, São Paulo, Brasil) e colheita dos embriões por via cirúrgica.

Através da laparotomia foi realizada a exposição do útero e sua lavagem com PBS adicionado de 1% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocell®, São Paulo, Brasil) com auxílio de um cateter na porção tubárica e sonda de Foley nº 10 no início da bifurcação uterina. Os embriões recuperados foram selecionados e classificados de acordo com a Sociedade

Internacional de Transferência de Embriões (IETS – Robertson & Nelson, 1998). Os que tiveram qualidade excelente e possuíam até 15% de células extrusas, além de citoplasma homogêneo foram classificados como grau I. Grau II ou III eram embriões com boa ou pobre qualidade, possuindo até 45 ou 75% de células extrusas, respectivamente. Além disso, embriões de grau III também possuíam citoplasma com aspecto granuloso e porção embrionária irregular. Embriões grau III não foram submetidos à criopreservação. Os classificados como grau I ou II foram encaminhados para o experimento. Após seleção, os embriões foram lavados em PBS adicionado de 20% de SFB (PBSplus) e mantidos em meio holding (Holding plus®, Vitrocell, São Paulo, Brasil), a 36°C, protegidos da luz, até o momento da criopreservação ou fixação.

Os embriões recuperados e selecionados foram divididos em três grupos: congelamento lento, vitrificação e controle. Os embriões frescos (grupo controle) foram avaliados quanto à atividade mitocondrial e estrutura do citoesqueleto por microscopia confocal (CCf) e, quanto à ultraestrutura, por microscopia eletrônica de transmissão (CMET), fixados em até duas horas após a colheita. Já os embriões criopreservados foram avaliados da mesma forma, porém, somente após seu aquecimento e cultivo *in vitro* (CIV) por 1 hora (Fig. 1).

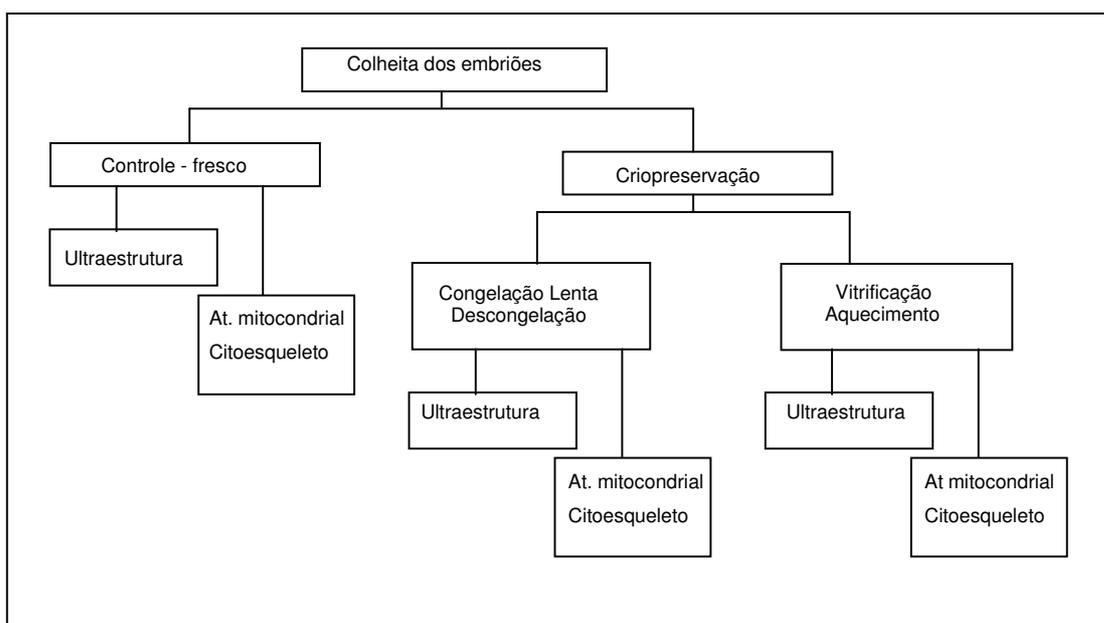


Figura 1. Desenho esquemático do delineamento experimental. At.: atividade

2.2 Congelação Lenta e Descongelção

Embriões destinados à congelação lenta foram submetidos ao protocolo proposto por Garcia-Garcia et al. (2005), sendo lavados em PBSplus e submetidos às soluções de criopreservação, que tiveram o PBSplus como meio base. Primeiramente, os embriões foram mantidos em 0,75M de EG por 10 minutos, seguindo para a solução de 1,5M de EG por 10 minutos, sempre à temperatura ambiente. Foram acondicionados em palhetas de 0,25mL (1 a 4 embriões/palheta) e colocados em máquina de congelação programável (Dominium K, Biocom®, Minas Gerais, Brasil). A curva de congelação utilizada consistiu, em resumo, de queda a $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até -7°C ; *seeding* a -7°C ; $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até -35°C . Após este período, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas por 2 a 9 meses.

Para a descongelção as palhetas foram colocadas em banho-maria a 32°C por 30 segundos. Os embriões foram expostos à solução de PBSplus com 0,25M de sacarose por 10 minutos, seguindo para três lavagens em solução de PBSplus por 5 minutos cada. Posteriormente, os embriões foram mantidos sob condições de CIV para posterior processamento e análises, constituindo os grupos CLMET para avaliação ultraestrutural e CLCf para análise de atividade mitocondrial e citoesqueleto.

2.3 Vitriificação em OPS e Aquecimento

Passado o período de manutenção em meio holding, o grupo destinado à vitriificação foi submetido ao protocolo proposto por Dattena et al., (2004), modificado. Após exposição à solução de PBSplus com 10% de EG e 10% de DMSO por 1 minuto e 30 segundos, os embriões foram submetidos à solução de PBSplus adicionada de 0,5M de sacarose com 20% de EG e 20% de DMSO, primeiramente em gota de 20 μL seguindo para uma microgota de 5 μL por um período total de 30 segundos. Posteriormente, os embriões foram acondicionados, por capilaridade, na porção final de palhetas Open Pulled Straws (OPS), mergulhadas diretamente em nitrogênio líquido, colocadas dentro de palhetas de 0,5 mL, lacradas e armazenadas por 2 a 9 meses.

O reaquecimento ocorreu pela imersão da porção final da OPS em solução de PBSplus adicionado de 0,25M de sacarose a 37°C por 6 segundos. Em seguida os embriões

foram lavados em solução com 0,25M de sacarose por 5 minutos, mais um banho em 0,15M de sacarose por 5 minutos e três lavagens em solução de PBSplus por 5 minutos cada. Posteriormente, os embriões foram mantidos sob condições de CIV para posterior processamento e análises, constituindo os grupos VMET para avaliação ultraestrutural e VCf para análise de atividade mitocondrial e citoesqueleto.

2.4 Cultivo *in Vitro*

Após a descongelação ou aquecimento dos embriões, estes foram submetidos às condições de cultivo *in vitro* proposto por Garcia-Garcia et al., (2005), sendo colocados em meio TCM 199 (TCM medium 199 Earle's salts, Sodium bicarbonate, Gibco®) suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina e antibióticos. As placas de cultivo foram mantidas em estufa a 38°C, com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada por 1 hora. Este período foi escolhido por coincidir com o tempo que antecederia a inovulação. Após o CIV, a qualidade embrionária foi novamente avaliada em estereomicroscópio com aumento de 80 vezes, e os embriões foram processados para microscopia eletrônica de transmissão ou destinados para avaliação de atividade mitocondrial e estrutura do citoesqueleto.

2.5 Análise de Atividade Mitocondrial e Estrutura do Citoesqueleto

Embriões frescos (CCf, n=21), congelados (CLCf, n=9) e vitrificados (VCf, n=12) foram avaliados quanto ao padrão de atividade mitocondrial e a organização dos filamentos de actina do citoesqueleto por microscopia confocal de varredura a laser. Para observação do padrão de atividade mitocondrial, os embriões foram equilibrados em meio TCM 199 adicionado de 2 mM de L-glutamina (meio base) por pelo menos 10 minutos antes da incubação com o fluorocromo. Primeiramente, foi realizada a marcação de mitocôndrias ativas através da incubação em 33,12µg/mL de Mitotracker Red CMXRos® (Invitrogen) em meio base por 15 minutos sob condições de CIV, como sugerido pelo fabricante. Após três lavagens sucessivas em meio base, os embriões foram fixados em paraformaldeído a 2,5% por 40 minutos a temperatura ambiente, protegidos da luz. Posteriormente, foram mantidos em PBS *overnight* a 4°C no escuro.

O processamento pós-fixação foi realizado com mínima exposição à luz e consistiu na lavagem do material em PBS adicionado 0,3% de polivinilpirrolidona (PVP), permeabilização em Triton-X 0,5% por 30 minutos e marcação dos filamentos de actina com 0,145 µg de Alexa Fluor 488 Phalloidin® (Invitrogen) em PBS por 1 hora e lavagem em PBS com 0,3% de PVP. Para identificação dos núcleos, os embriões foram marcados com 0,2µg/mL de 4',6'-diamidino-2-phenylindole hydrochloride (DAPI® Nuclei Acid Stain, Invitrogen) por 20 minutos. Posterior à marcação, os embriões foram lavados em PBS e postos sobre lâminas de vidro com poços adesivos (Secure-Seal imaging spacers, Sigma®) e cobertos com lamínulas.

Para avaliação dos embriões foi utilizado o microscópio confocal de varredura a laser Leica DSM5. A visualização da marcação nuclear com o fluorocromo DAPI® foi obtida com o uso do laser DIODO na frequência de excitação de 405nm e emissão de 460nm. Para excitação de Alexa Fluor 488 Phalloidin® foi usado o laser argônio na frequência de excitação de 499nm e emissão de 520nm. De modo semelhante, para a visualização de Mitotracker Red CMXRos foi utilizado o laser Hélio neon 594 nas frequências de excitação de 578nm e de emissão 600nm.

2.6 Avaliação da Ultraestrutura

Embriões frescos (CMET, n= 13), congelados (CLMET, n= 9) e vitrificados (VMET, n= 9) foram fixados por 2 horas em karnovsky (solução de 2,5% de glutaraldeído e 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, com pH 7,3) a temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a pós-fixação em tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 0,8% e 5mM cloreto de cálcio por 1 hora no escuro, lavagem em cacodilato de sódio 0,1M, contrastação em acetato de uranila aquoso a 0,5% a 4°C no escuro por 2 horas, rápida lavagem em água destilada e desidratação gradual em acetona (30, 50, 70, 90 e 100%, 10 minutos cada), seguindo para a inclusão em resina Spurr após infiltração gradual pela substituição da acetona (2:1, 1:1, 1:2 e resina pura). Para sua polimerização e confecção dos blocos, o material em resina foi mantido em estufa a 60°C por 48 horas.

Cortes semifinos (3 a 4µm) foram corados com azul de toluidina e observados ao microscópio de luz para localização do botão embrionário de blastocistos. Os cortes

ultrafinos (70nm) foram realizados com faca de diamante e pescados em telas de cobre de 150 *mesh*, secos naturalmente e observados ao microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1011 para avaliação da ultraestrutura das células do botão embrionário e do trofoblasto dos blastocistos e blastômeros das mórulas.

2.7 Análise Estatística

As porcentagens de embriões viáveis e degenerados foram comparadas entre os tratamentos pelo teste Qui-quadrado. Os dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação no Estereomicroscópio

Foi recuperado um total de 194 estruturas, sendo que 79 corresponderam a embriões de grau I e II, 58 embriões de grau III e 57 estruturas classificadas como degeneradas, atrasadas ou não fecundadas. Dentre os embriões classificados como de grau I ou II, 22 foram congelados, 24 vitrificados e o restante tidos como controle, parte direcionada para análise da atividade mitocondrial e citoesqueleto por microscopia confocal (CCf) e parte para microscopia eletrônica de transmissão (CMET). Também foram processados embriões classificados como grau III, somente a título de controle, sendo três para microscopia confocal e dois para microscopia eletrônica de transmissão.

Após o reaquecimento os embriões criopreservados foram submetidos ao CIV por uma hora e posterior reavaliação da qualidade embrionária em estereomicroscopia com os mesmos critérios do grupo controle. Dentre os embriões vitrificados, 45,8% mantiveram a qualidade do momento da criopreservação, enquanto que 33,4% degeneraram. Dentre os congelados, 22,7% mantiveram a qualidade e 13,7% degeneraram. Considerando embriões de grau I, II e III como viáveis, a taxa de embriões transferíveis após vitrificação e congelamento lenta foi de 66,6 e 86,3%, respectivamente, porém, não houve diferença estatística. Houve diferença significativa somente ao se comparar o número de embriões congelados que tiveram sua qualidade diminuída para grau II ou III, que foi superior ao grupo vitrificado ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1- Relação dos embriões que mantiveram sua qualidade, diminuíram para grau II ou III ou degeneraram após o reaquecimento e CIV por 1 hora.

	Vitrificados	Congelados	Total
Mantiveram a qualidade	45,8% (11/24)	22,7% (5/22)	34,8% (16/46)
Diminuíram para grau II ou III	20,8% (5/24) ^a	63,6% (14/22) ^b	41,3% (19/46)
Degeneraram	33,4% (8/24)	13,7% (3/22)	23,9% (11/46)
Total	24	22	46

Letras diferentes correspondem a índices que diferiram estatisticamente ($p < 0,05$)

3.2 Análise de Atividade Mitocondrial e Estrutura do Citoesqueleto

O grupo de embriões frescos mostrou boa arquitetura dos filamentos de actina (Fig. 2A e B), independente do estágio de desenvolvimento. Contudo, foi detectada em embriões de grau III que apenas a pequena massa embrionária viável apresentava citoesqueleto organizado (Figura 2C e D). Quanto à marcação do padrão de atividade mitocondrial, esta foi intensa em embriões de qualidade I e II, independente do estágio de desenvolvimento embrionário, porém, menor em embriões de qualidade grau III e nas porções de células extrusas, mesmo em embriões de qualidade grau I ou II (Fig. 2A e B).

Um achado marcante foi que em blastocistos iniciais, caracterizados pela presença de blastocele em formação, pôde-se observar certa diferenciação do citoesqueleto, que apresentou aspecto peculiar com dilatações circulares em algumas regiões (Fig. 3A). Ainda interessante foi que a mesma organização diferenciada destes filamentos de actina vista em blastocistos iniciais foi também identificada em alguns embriões classificados como mórulas na estereomicroscopia. Estes, ao serem visualizados no microscópio confocal, apresentavam início de blastocele (Figura 3B).

Os blastocistos e blastocistos expandidos frescos demonstraram semelhança quanto à organização dos filamentos de actina, preservando suas particularidades com relação ao tamanho da massa celular interna (MCI) e blastocele (Figura 4A e B).

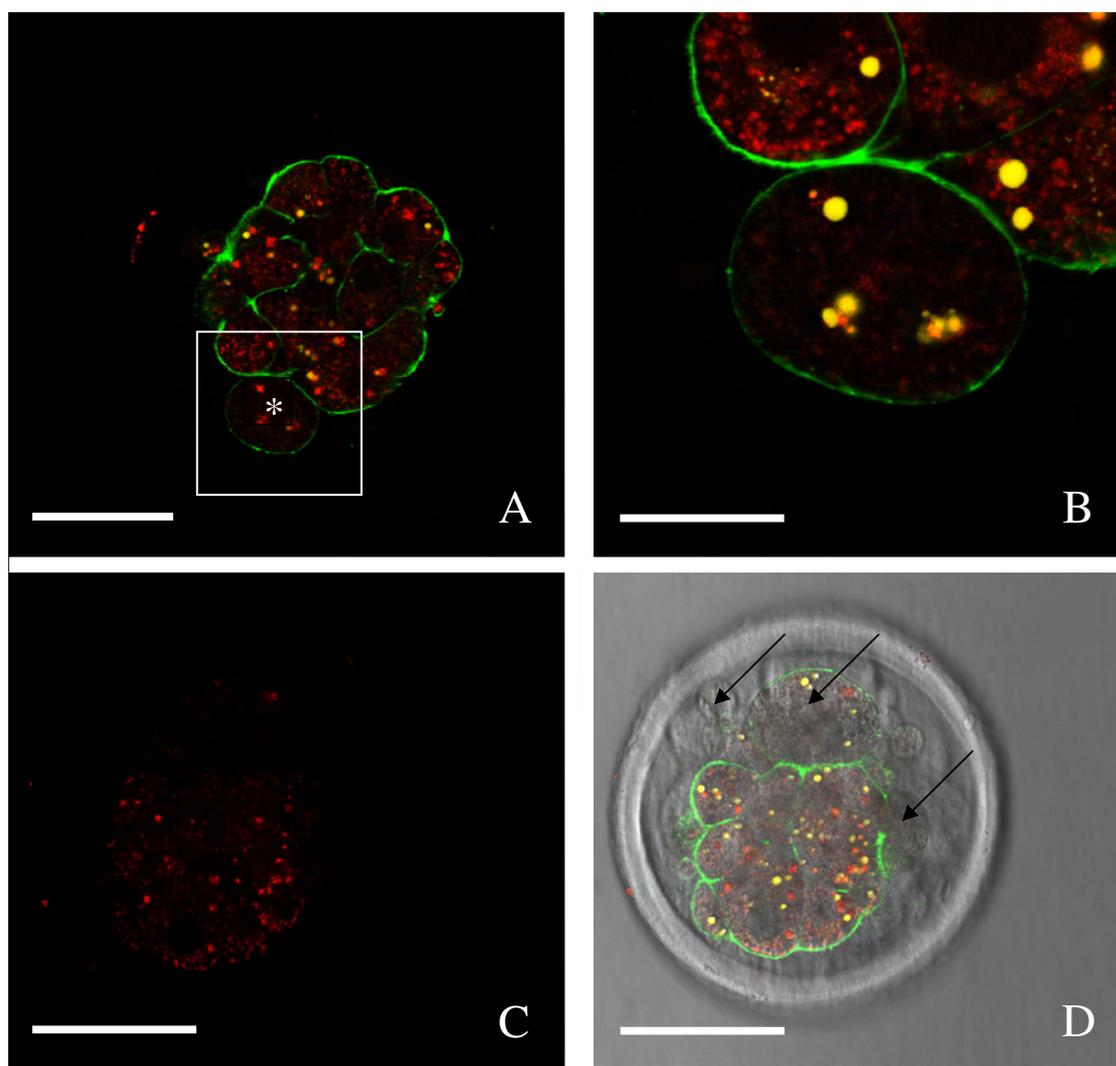


Figura 2. Avaliação no microscópio confocal dos filamentos de actina (verde) e padrão de atividade mitocondrial (vermelho) de embriões frescos. A) Mórula de grau I mostrando boa organização do citoesqueleto e de atividade mitocondrial, célula extrusa (*). Barra = 50 μ m. B) detalhe com melhor visualização de célula extrusa apresentando menor marcação da atividade mitocondrial. Barra= 20 μ m . C) Mórula de grau III mostrando diminuição de marcação mitocondrial na massa embrionária viável e sua ausência na porção extrusa. Barra= 40 μ m . D) visualização da mesma mórula em campo claro: notar boa organização do citoesqueleto na massa celular viável e ausência de marcação nas células extrusas (seta). Barra= 40 μ m. A marcação amarela corresponde a lipídeos.

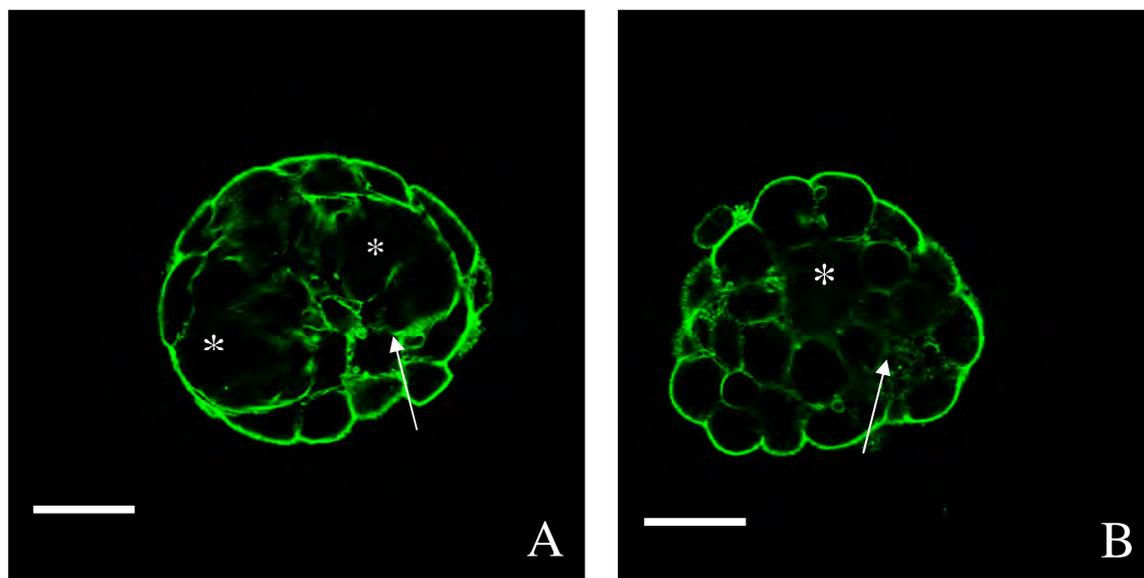


Figura 3. Avaliação no microscópio confocal dos filamentos de actina de embriões frescos. A) Blastocisto inicial com blastocele (*) ainda em processo de formação e com aspecto peculiar do citoesqueleto (seta). B) embrião classificado como mórula de grau I na estereomicroscopia, mas que apresentou conformação diferenciada dos filamentos de actina (setas) e início de formação da blastocele (*). Barras = 40 μ m.

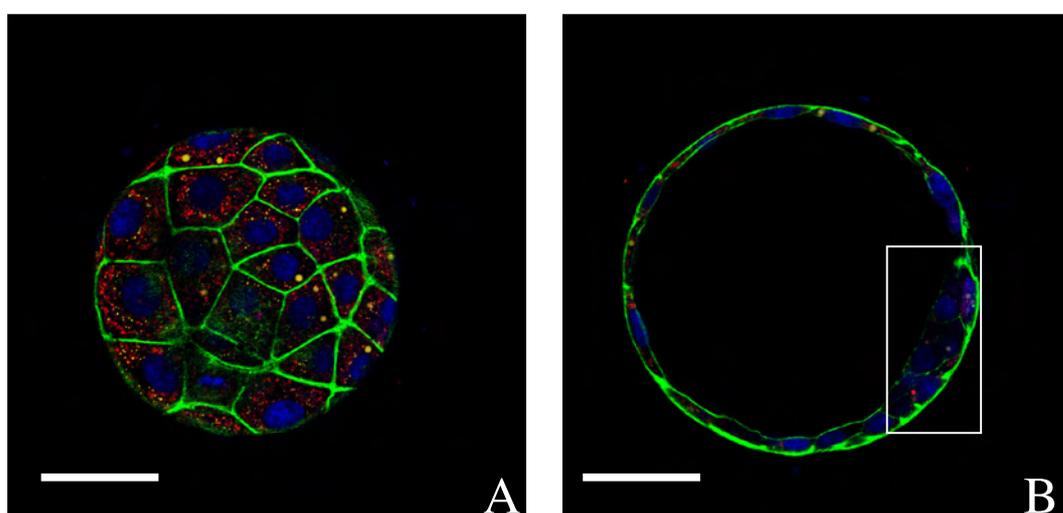


Figura 4. Avaliação no microscópio confocal dos filamentos de actina (verde) e padrão de atividade mitocondrial (vermelho) de embriões frescos. Blastocisto expandido de grau I. A) região do trofoblasto. B) MCI (destaque) (B). Núcleos em azul, marcação amarela corresponde a lipídeos. Barras = 50 μ m.

Embriões congelados ou vitrificados mostraram certo grau de desorganização dos filamentos de actina, principalmente em mórulas, e não reestruturação da blastocele,

mesmo em embriões classificados como de grau I ou II (Fig. 5A e B). Comumente foram vistos feixes dos filamentos de actina com aspecto granuloso e não delimitado como no grupo controle, demonstrando sinais de desestruturação (Fig. 5C). Além disso, mesmo em embriões vitrificados/aquecidos que mostraram melhor reestruturação da blastocele na estereomicroscopia, foram vistos vários pontos de descontinuidade do citoesqueleto (Fig. 6), característica que não foi detectada em embriões congelados/descongelados. Com relação ao padrão de atividade mitocondrial nos embriões criopreservados, não houve marcação, independente do tratamento e grau de qualidade embrionária.

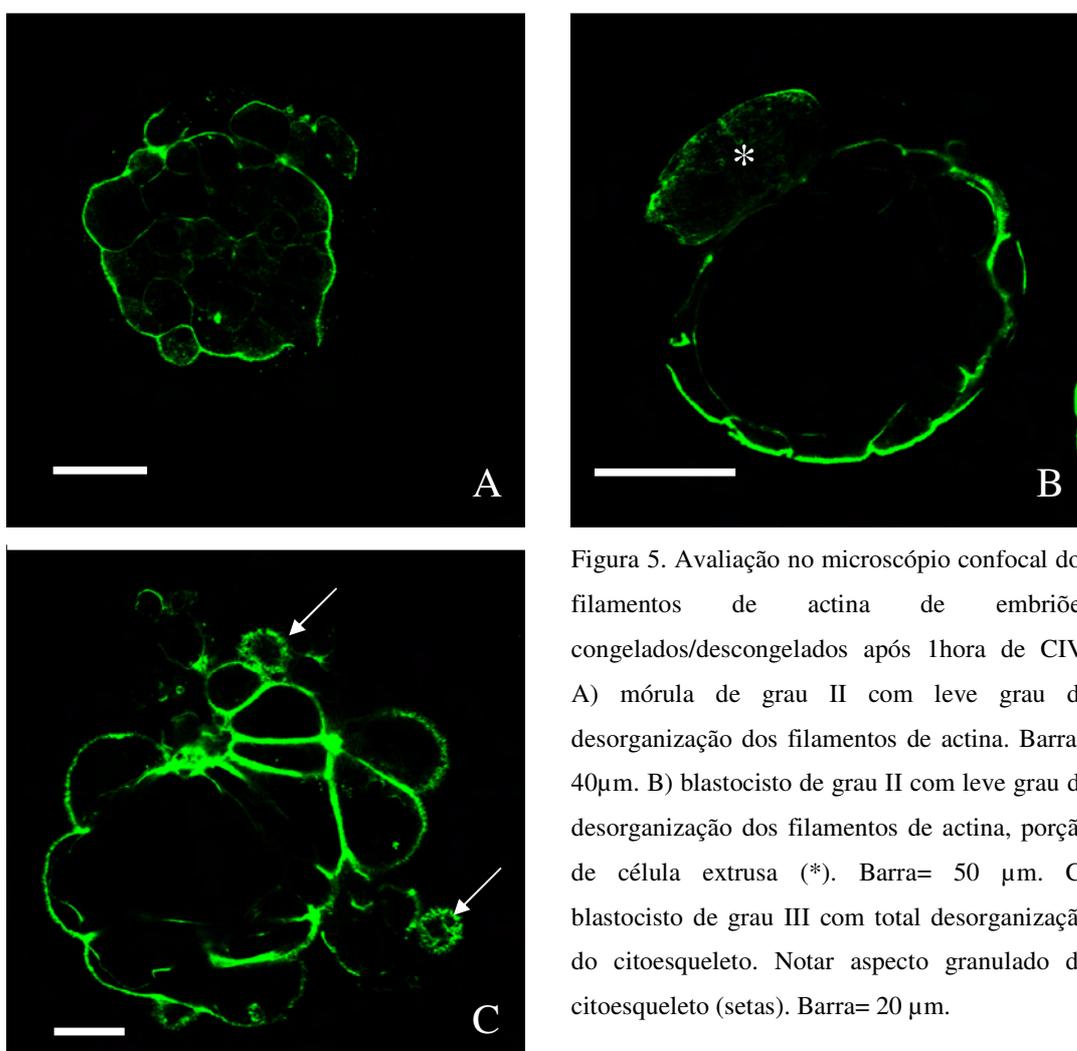


Figura 5. Avaliação no microscópio confocal dos filamentos de actina de embriões congelados/descongelados após 1 hora de CIV. A) mórula de grau II com leve grau de desorganização dos filamentos de actina. Barra= 40 μ m. B) blastocisto de grau II com leve grau de desorganização dos filamentos de actina, porção de célula extrusa (*). Barra= 50 μ m. C) blastocisto de grau III com total desorganização do citoesqueleto. Notar aspecto granuloso do citoesqueleto (setas). Barra= 20 μ m.

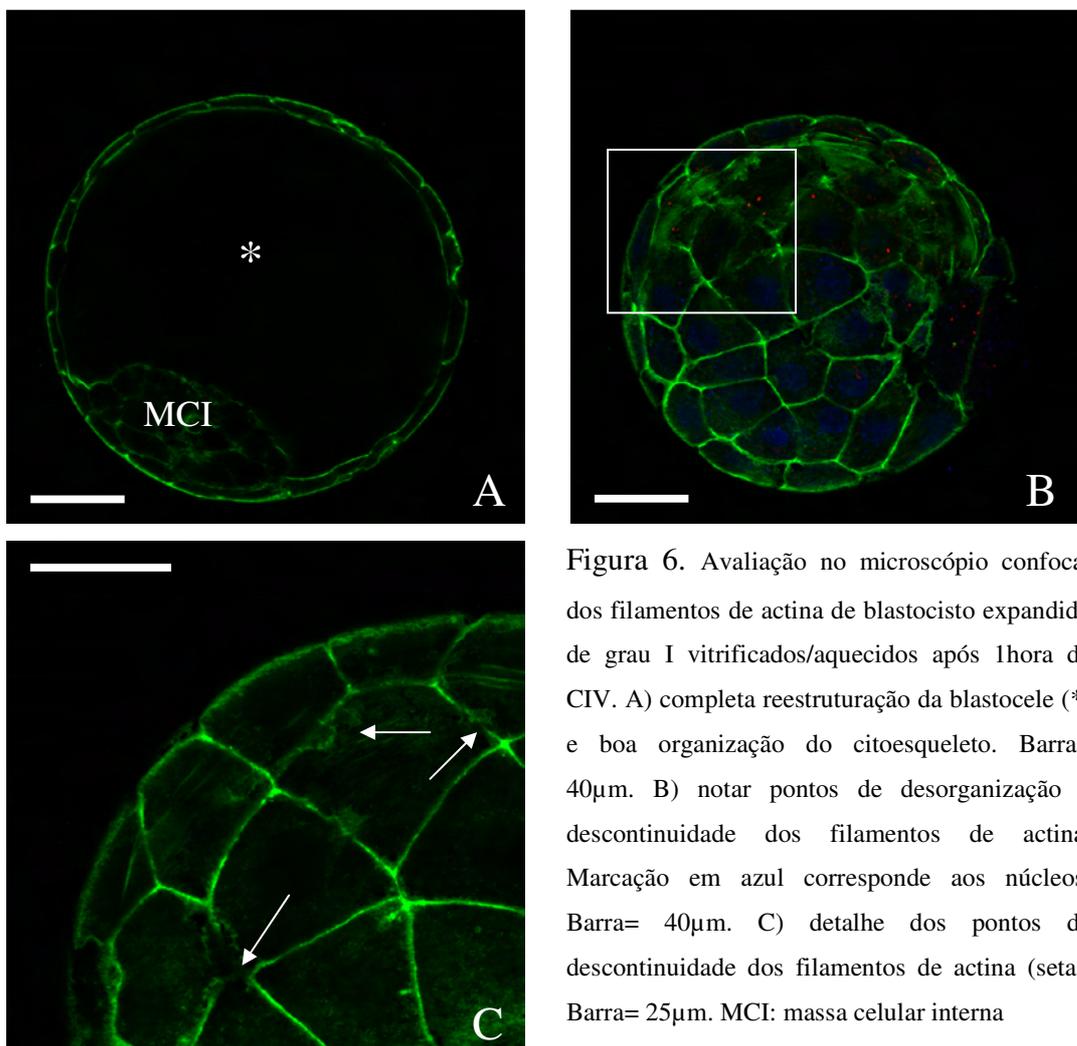


Figura 6. Avaliação no microscópio confocal dos filamentos de actina de blastocisto expandido de grau I vitrificados/aquecidos após 1 hora de CIV. A) completa reestruturação da blastocele (*) e boa organização do citoesqueleto. Barra= 40µm. B) notar pontos de desorganização e descontinuidade dos filamentos de actina. Marcação em azul corresponde aos núcleos. Barra= 40µm. C) detalhe dos pontos de descontinuidade dos filamentos de actina (seta). Barra= 25µm. MCI: massa celular interna

3.3 Avaliação Estrutural

Através da avaliação dos cortes semifinos em microscopia de luz foi possível identificar a organização das células em diferentes estágios de desenvolvimento embrionário. Mórulas do grupo controle mostraram grande aproximação entre os blastômeros, porém maior espaço perivitelínico (Fig. 7A). Um aspecto vesiculoso foi observado nas células, tanto na porção da massa embrionária viável, quanto nas células extrusas, quando presentes. À medida que o embrião se diferenciava em blastocisto inicial, com a formação da blastocele, os blastômeros que então formariam o trofoblasto, se alongavam e os da futura MCI formavam

prolongamentos e se distanciavam uns dos outros. Embriões em fase de blastocisto apresentaram células do trofoblasto mais alongadas e próximas umas das outras e da zona pelúcida, tendo um mínimo espaço perivitelínico, que diminuía ainda mais pela expansão do embrião. As células da MCI possuíam grandes prolongamentos que terminavam em pontos de contato entre elas. Nesta fase, as células do embrião passaram a apresentar menos vesículas, tanto em número quanto tamanho, tendo, assim, um citoplasma mais homogêneo, exceto em massas celulares extrusas, que permaneceram com citoplasma bastante vesiculoso (Fig. 7B e C). Além disso, alguns embriões classificados como mórulas no estereomicroscópio se mostraram em início de diferenciação a blastocisto inicial na microscopia óptica.

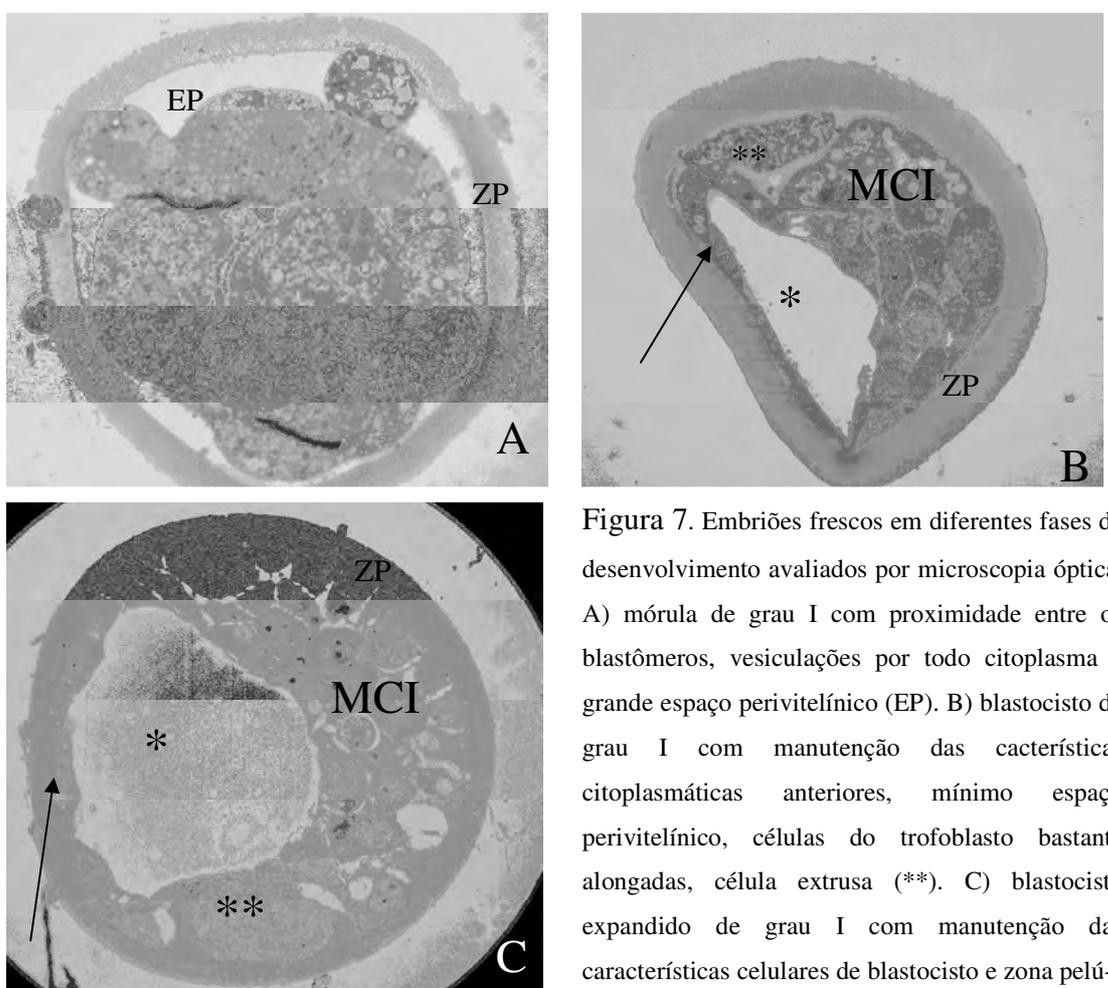


Figura 7. Embriões frescos em diferentes fases de desenvolvimento avaliados por microscopia óptica. A) mórula de grau I com proximidade entre os blastômeros, vesiculações por todo citoplasma e grande espaço perivitelínico (EP). B) blastocisto de grau I com manutenção das características citoplasmáticas anteriores, mínimo espaço perivitelínico, células do trofoblasto bastante alongadas, célula extrusa (**). C) blastocisto expandido de grau I com manutenção das características celulares de blastocisto e zona pelúcida delgada. EP: espaço perivitelínico; ZP: zona pelúcida; *: blastocele; MCI: massa celular interna; seta: célula do trofoblasto.

Figura 7. Embriões frescos em diferentes fases de desenvolvimento avaliados por microscopia óptica. A) mórula de grau I com proximidade entre os blastômeros, vesiculações por todo citoplasma e grande espaço perivitelínico (EP). B) blastocisto de grau I com manutenção das características citoplasmáticas anteriores, mínimo espaço perivitelínico, células do trofoblasto bastante alongadas, célula extrusa (**). C) blastocisto expandido de grau I com manutenção das características celulares de blastocisto e zona pelúcida delgada. EP: espaço perivitelínico; ZP: zona pelúcida; *: blastocele; MCI: massa celular interna; seta: célula do trofoblasto.

Obedecendo ao padrão de desenvolvimento do grupo controle, os embriões após criopreservação, tanto por congelamento lento quanto por vitrificação, mantiveram as características de acordo com seu grau de qualidade atribuídas por estereomicroscopia após descongelamento/aquecimento. Porém, na microscopia óptica foram encontradas diferenças marcantes: o citoplasma das células se tornou mais heterogêneo, com a concentração de organelas e vesículas, resultando em grandes áreas citoplasmáticas livres de organelas, maior tamanho do espaço perivitelínico dos blastocistos e maior quantidade de debris neste local (Fig. 8 e 9). Blastocistos que passaram pelo processo de criopreservação não atingiram completa reestruturação da blastocele, achado já exposto na avaliação por estereomicroscopia (Fig. 8B e C e 9B e C). Mesmo com semelhante aparência citoplasmática, embriões vitrificados apresentaram maior desorganização entre as células, conferindo ao embrião um aspecto mais desorganizado em comparação ao grupo congelado de mesma qualidade (Fig 8 e 9).

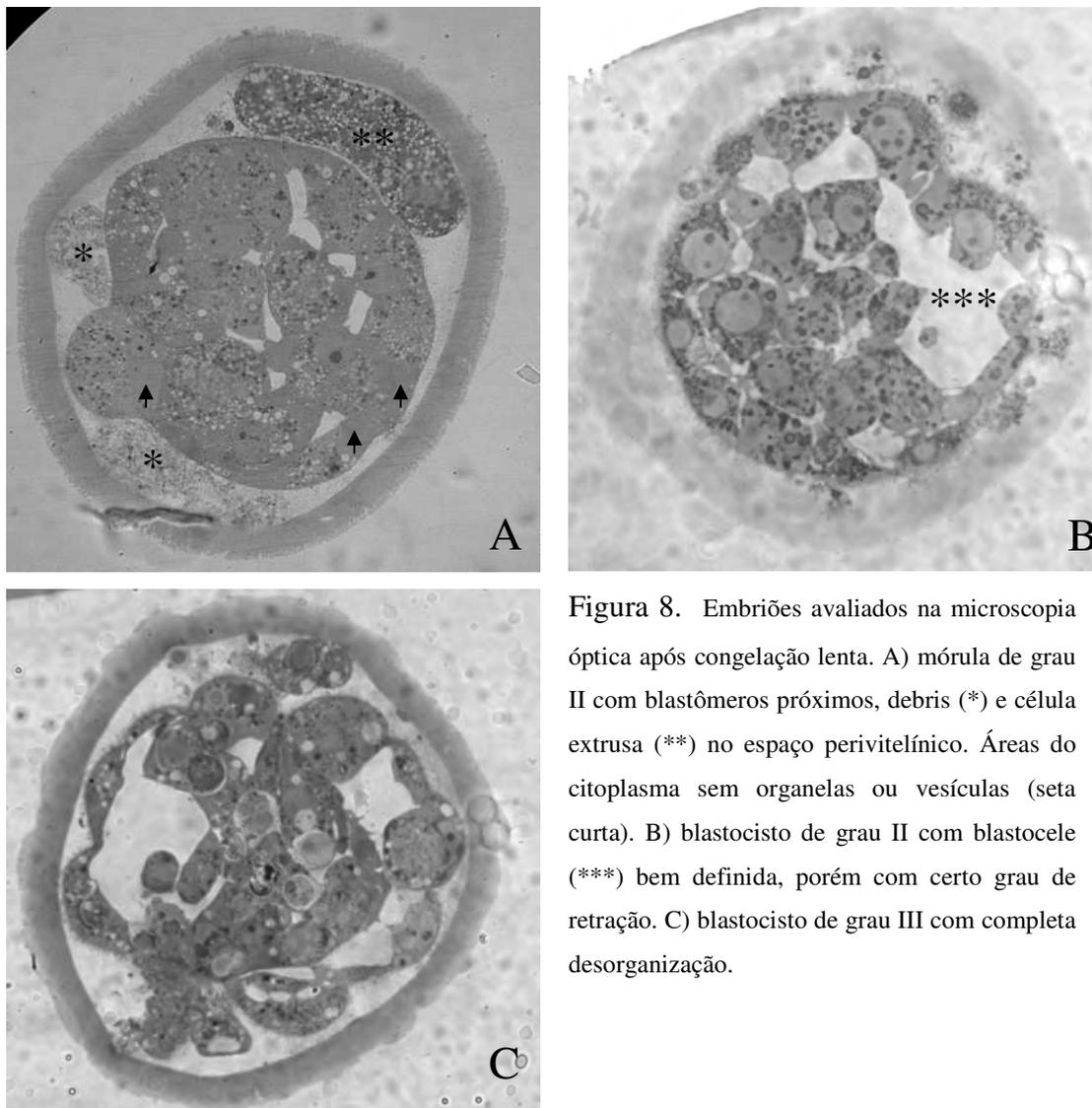


Figura 8. Embriões avaliados na microscopia óptica após congelação lenta. A) mórula de grau II com blastômeros próximos, debris (*) e célula extrusa (**) no espaço perivitelínico. Áreas do citoplasma sem organelas ou vesículas (seta curta). B) blastocisto de grau II com blastocele (***) bem definida, porém com certo grau de retração. C) blastocisto de grau III com completa desorganização.

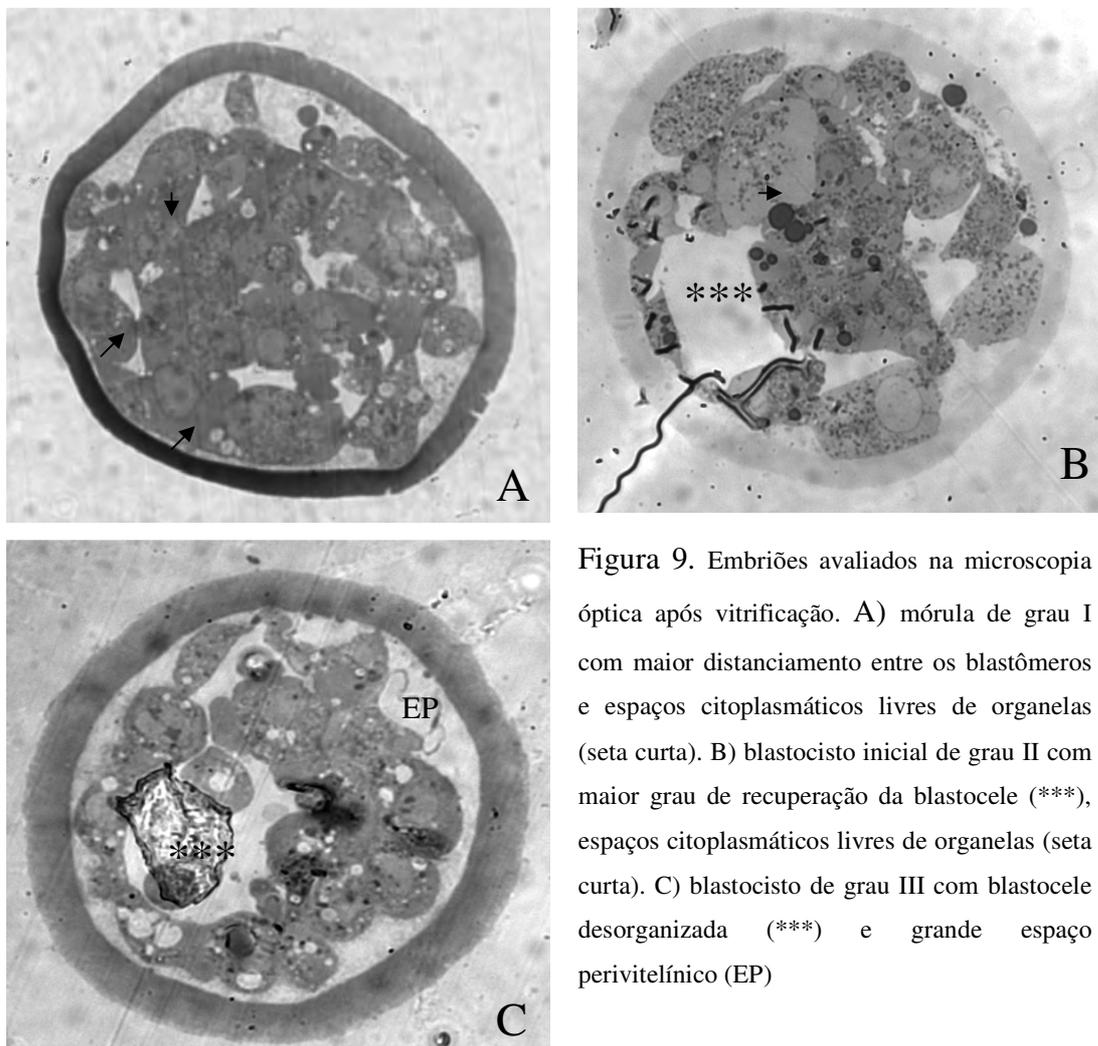


Figura 9. Embriões avaliados na microscopia óptica após vitrificação. A) mórula de grau I com maior distanciamento entre os blastômeros e espaços citoplasmáticos livres de organelas (seta curta). B) blastocisto inicial de grau II com maior grau de recuperação da blastocele (***), espaços citoplasmáticos livres de organelas (seta curta). C) blastocisto de grau III com blastocele desorganizada (***) e grande espaço perivitelínico (EP)

A diferença entre embriões de diferentes qualidades classificados no estereomicroscópio foi a proporção de células extrusas, o que coincidiu com os achados na microscopia óptica, porém, a distribuição das organelas pelo citoplasma e a maior incidência de debris no espaço perivitelínico foram alterações vistas na microscopia de luz dos grupos tratados.

3.4 Avaliação Ultraestrutural

Em mórulas de grau I e II, os blastômeros apresentavam núcleo grande e esférico, membrana nuclear íntegra, geralmente com um ou dois nucléolos. O citoplasma das células apresentava grande quantidade de vesículas, muitas delas coalescentes, grandes gotas lipídicas, retículo endoplasmático liso (REL), complexo de Golgi próximo ao núcleo e abundante número de mitocôndrias, predominantemente *hooded* (Fig. 10A). Grandes mitocôndrias de formato redondo ou oval, eletrondensas, com cristas periféricas também eram comuns, muitas delas em aparente divisão e sempre com intensa relação com REL (Fig. 10B). Junções entre as células foram observadas, predominantemente zonas de adesão. Mórulas de grau III apresentaram maior granulação e desorganização citoplasmática, possuindo áreas livres de organelas e grande quantidade de pequenas vesículas (Fig. 10C). Houve também a visualização de mitocôndrias degeneradas (Fig. 10D).

Em fase de blastocisto, foi possível visualizar as modificações presentes nas células da MCI e trofoblasto. Células da MCI possuíam prolongamentos, que proporcionavam maior região de contato entre suas células, e grandes vesículas de digestão intercelular (Fig. 11A). As células do trofoblasto apresentaram formato alongado, com organelas próximas à ZP e desenvolvimento das microvilosidades, tanto em número, quanto em comprimento (Fig. 11B). Como características comuns a estes dois tipos celulares foram encontrados maior granulação citoplasmática, grandes gotas lipídicas e presença de polirribossomos (Fig. 11C). Outra característica marcante foi a diminuição do número de mitocôndrias *hooded*, grande variação do formato mitocondrial, bem como a ocorrência de cristas transversais em sua maioria. Houve a manutenção da intensa relação mitocondrial com REL e a disposição perinuclear do complexo de Golgi, assim como nos estágios anteriores de desenvolvimento.

Após sua expansão, os blastocistos permaneceram com mesma distribuição e arquitetura celulares, mitocôndrias pleomórficas, com cristas transversais, porém com menor eletrodensidade e, além de intensa relação com REL, passou a ter mesmo grau de aproximação com o retículo endoplasmático rugoso (RER). Alteração marcante encontrada nesta fase de desenvolvimento foi a intensa granulação citoplasmática e nuclear, e maior densidade de polirribossomos. A grande frequência de desossomos, promovendo adesão

entre as células, também foi característica particular desta fase que antecede a eclosão (Fig. 11D).

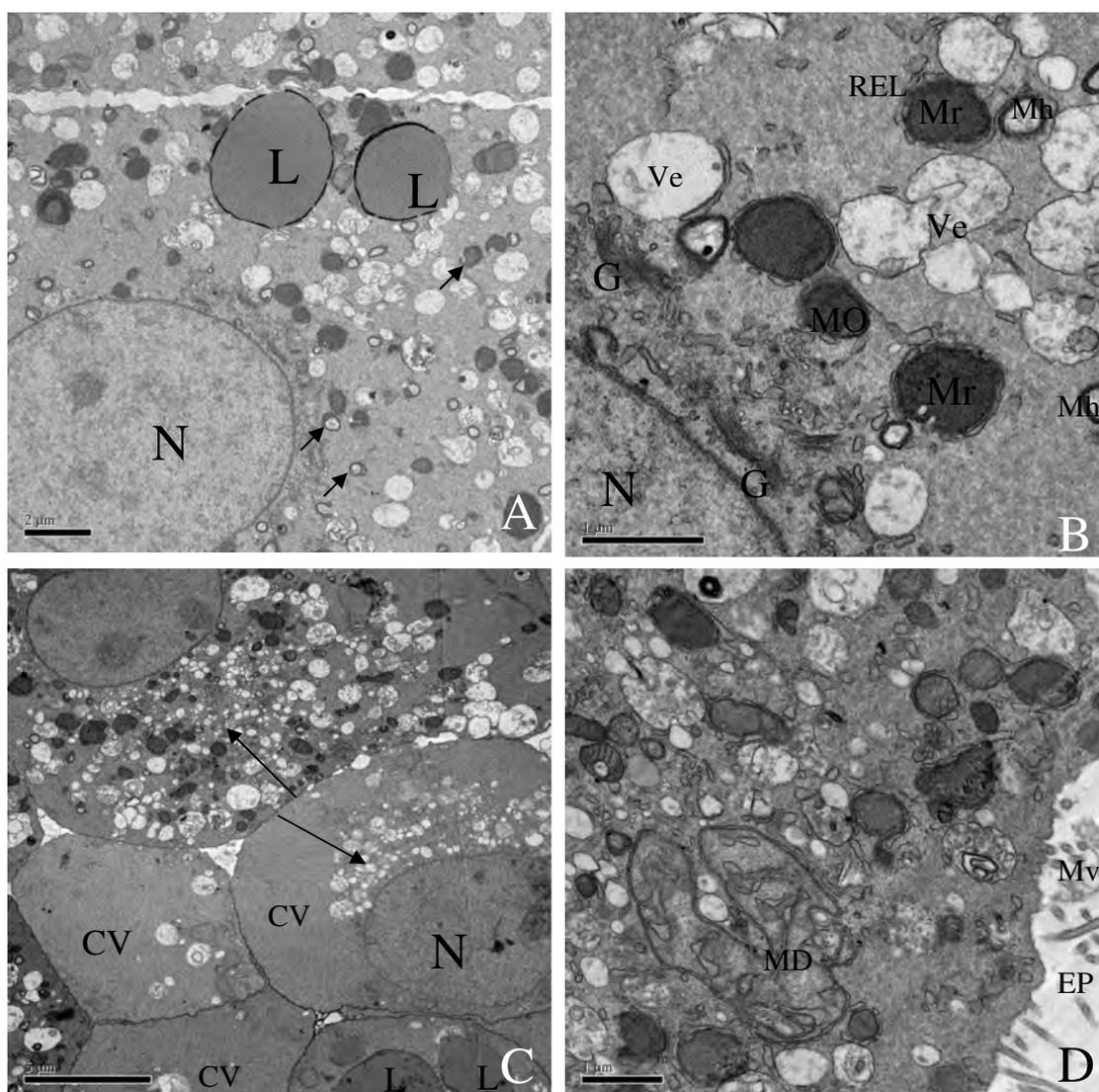


Figura 10. Embriões frescos avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. A) características citoplasmáticas de mórula de grau I, mitocôndria *hooded* (seta curta). B) mórula de grau I, detalhe da distribuição perinuclear do complexo de Golgi (G), mitocôndrias ovais (MO), redondas (Mr) e *hooded* (Mh), vesículas (Ve) e retículo endoplasmático (REL) com intensa relação com mitocôndrias. C) mórula de grau III contendo grandes espaços citoplasmáticos vazios (CV) e concentração de pequenas vesículas (seta longa). D) mitocôndria degenerada (MD) em mórula de grau III. N: núcleo, EP: espaço perivitelínico, L: gota lipídica, Mv: microvilosidade.

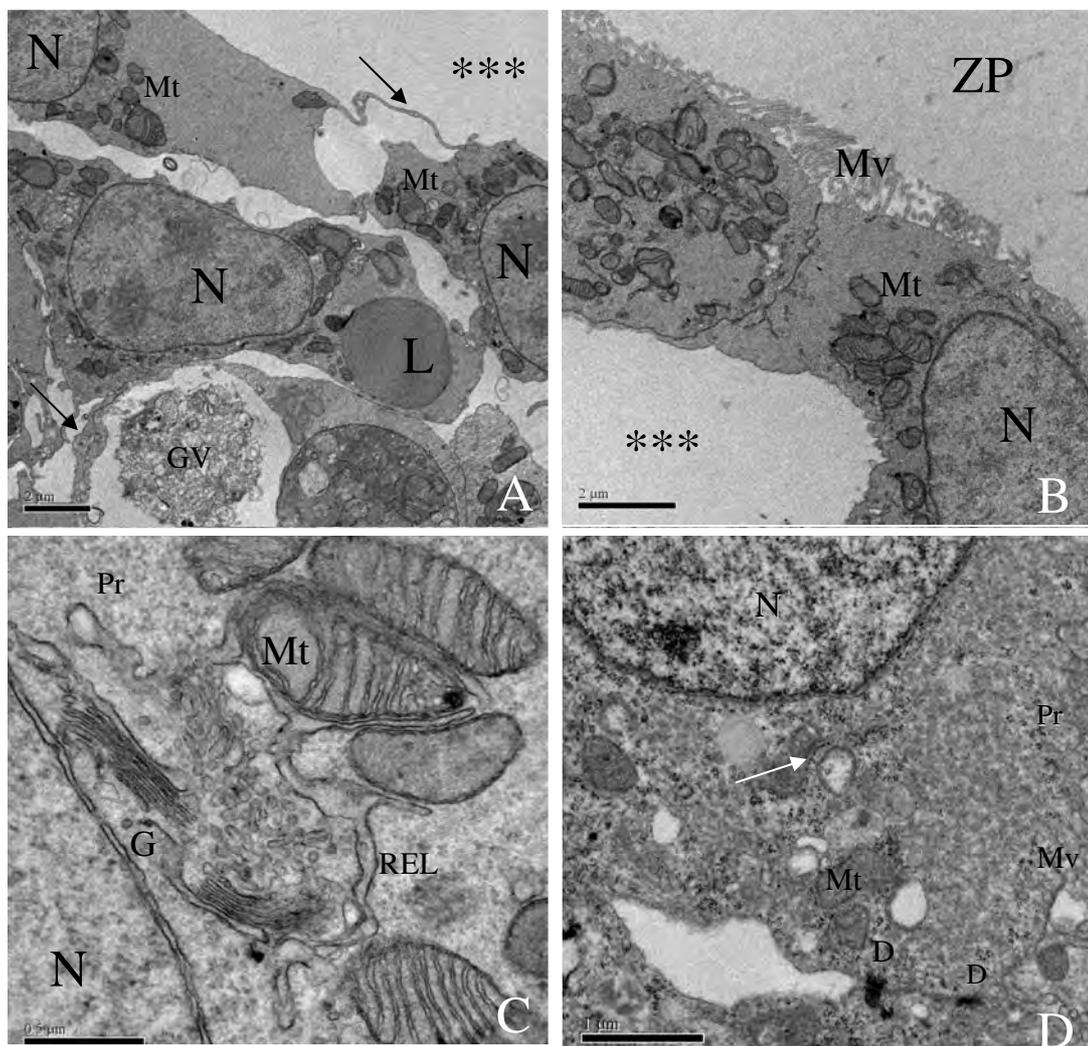


Figura 11. Embriões frescos avaliados em microscopia eletrônica de transmissão. A) observar prolongamentos celulares da MCI (seta preta) de blastocisto de grau I com mitocôndrias (Mt) polimórficas e grande vesícula de digestão (GV). B) blastocisto de grau I com grande relação de contato entre microvilosidades (Mv) e ZP. C) maior granulação citoplasmática em células de blastocisto de grau I, mitocôndrias (Mt), retículo endoplasmático liso (REL) e complexo de Golgi (G). D) blastocisto expandido de grau I com intensa granulação citoplasmática e abundância de polirribossomos (Pr), mitocôndrias de menor eletrodensidade (Mt), retículo endoplasmático rugoso (seta branca) e desmossomos (D). N: núcleo, ZP: zona pelúcida, ***: blastocelo, L: gota lipídica.

Embriões congelados/descongelados que mantiveram sua qualidade em grau I ou II apresentaram grandes semelhanças ao grupo controle (Fig. 12A e B). No entanto, algumas alterações ultraestruturais foram observadas, como: diminuição do contato entre microvilosidades e ZP nos blastocistos, turgidez de REL e mitocôndrias (Fig. 12C e D),

menor frequência de desmosomos, eventualmente complexo de Golgi fora da região perinuclear, além de regiões citoplasmáticas livres de organelas e locais com descontinuidade, principalmente na periferia de gotas lipídicas.

Embriões de grau III após o processo de congelação/descongelação apresentaram grande quantidade de células extrusas e debris no espaço perivitelínico, REL túrgido, citoplasma heterogêneo e intensa vesiculação celular, além de grande quantidade de mitocôndrias degeneradas e grandes vesículas de digestão (Fig. 13). Apesar da vesiculação celular e degeneração mitocondrial em comum com embriões frescos de grau III, no controle o citoplasma apresentava-se homogêneo e não houve turgidez de REL.

Em comparação ao grupo controle e congelado/descongelado, embriões vitrificados/aquecidos que mantiveram qualidade I ou II apresentaram quantidade de vesículas, granulação citoplasmática, relação mitocondrial com REL, debris no espaço perivitelínico e microvilosidades semelhantes aos congelados, contudo a presença de grandes vesículas de digestão celular foi marcante após a vitrificação de mórulas e blastocistos iniciais de grau II, característica presente nos demais grupos de mesma qualidade somente após a fase de blastocisto (Fig. 14A). Locais com descontinuidade citoplasmática também foram comuns após a vitrificação (Fig. 14B), assim como nos congelados. Foi observado neste grupo mórulas com mitocôndrias alongadas e ricas em cristas transversais (Fig. 14C), assim como no grupo congelado.

Embriões vitrificados de grau III obedeceram ao mesmo padrão de características apresentado pelo grupo congelado/descongelado de mesma qualidade. Mitocôndrias e REL túrgidos, vesiculação citoplasmática, grande quantidade de debris e células extrusas foram características comuns a estes dois grupos. Grandes vesículas de digestão ocupando quase a totalidade do citoplasma e a maior ocorrência de células degeneradas entre células da porção embrionária viável foram características encontradas somente neste grupo vitrificado (Figura 14D, E e F).

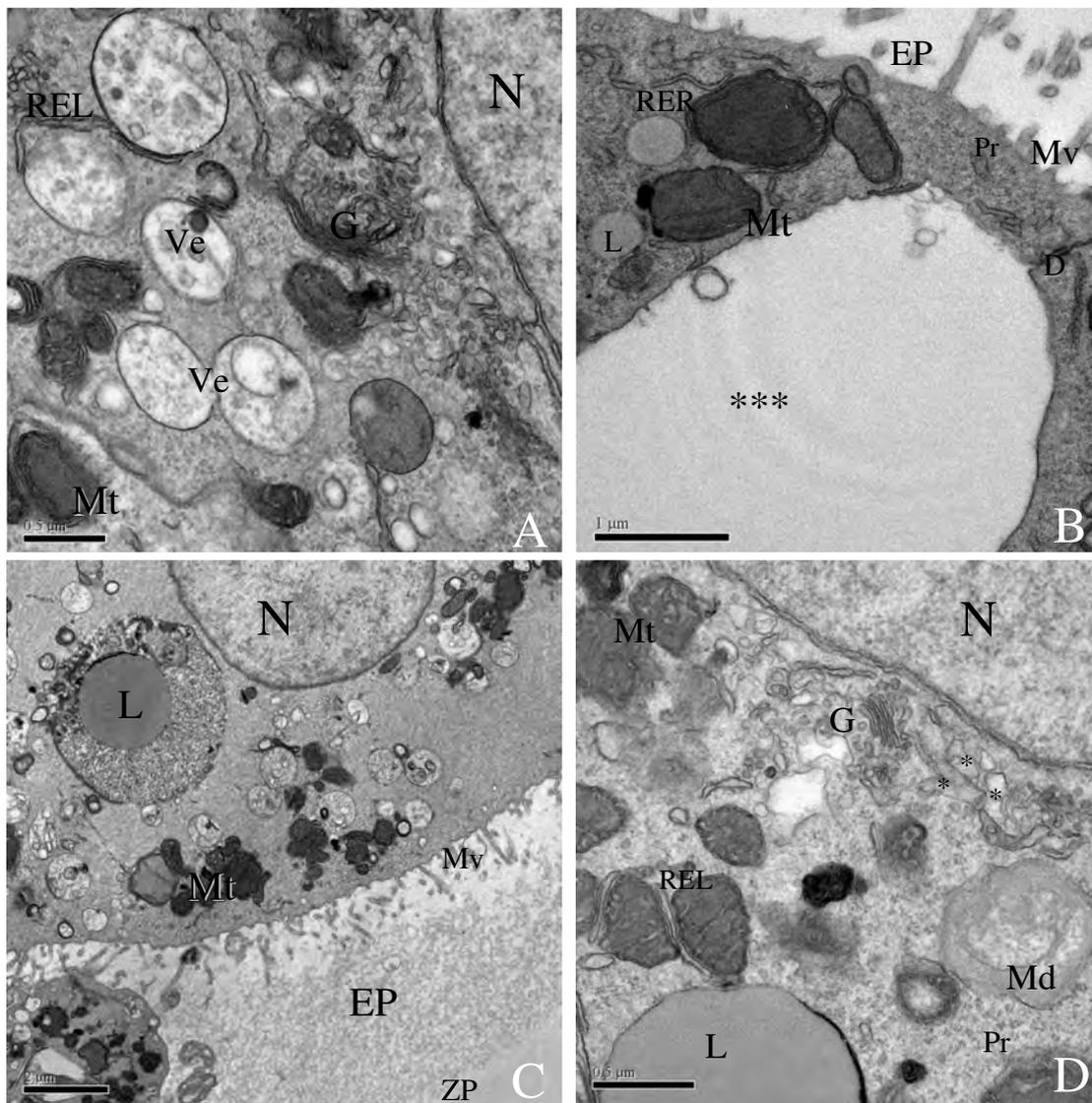


Figura 12. Embriões congelados/descongelados avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. A) blastocisto de grau II mostrando semelhanças ultraestruturais ao grupo controle. B) blastocisto expandido de grau II com desmossomo (D) ligando células do trofoblasto. C) blastocisto de grau II com boa aparência ultraestrutural. D) blastocisto de grau II com mitocôndrias normais (Mt) e degenerada (Md), complexo de Golgi (G), retículo endoplasmático liso normal (REL) e túrgido (*) e polirribossomos (Pr). Ve: Vesícula de digestão, Mv: microvilosidades, N: núcleo, EP: espaço perivitelínico, L: gota lipídica, RER: retículo endoplasmático rugoso, Pr: polirribossomos, ZP: zona pelúcida.

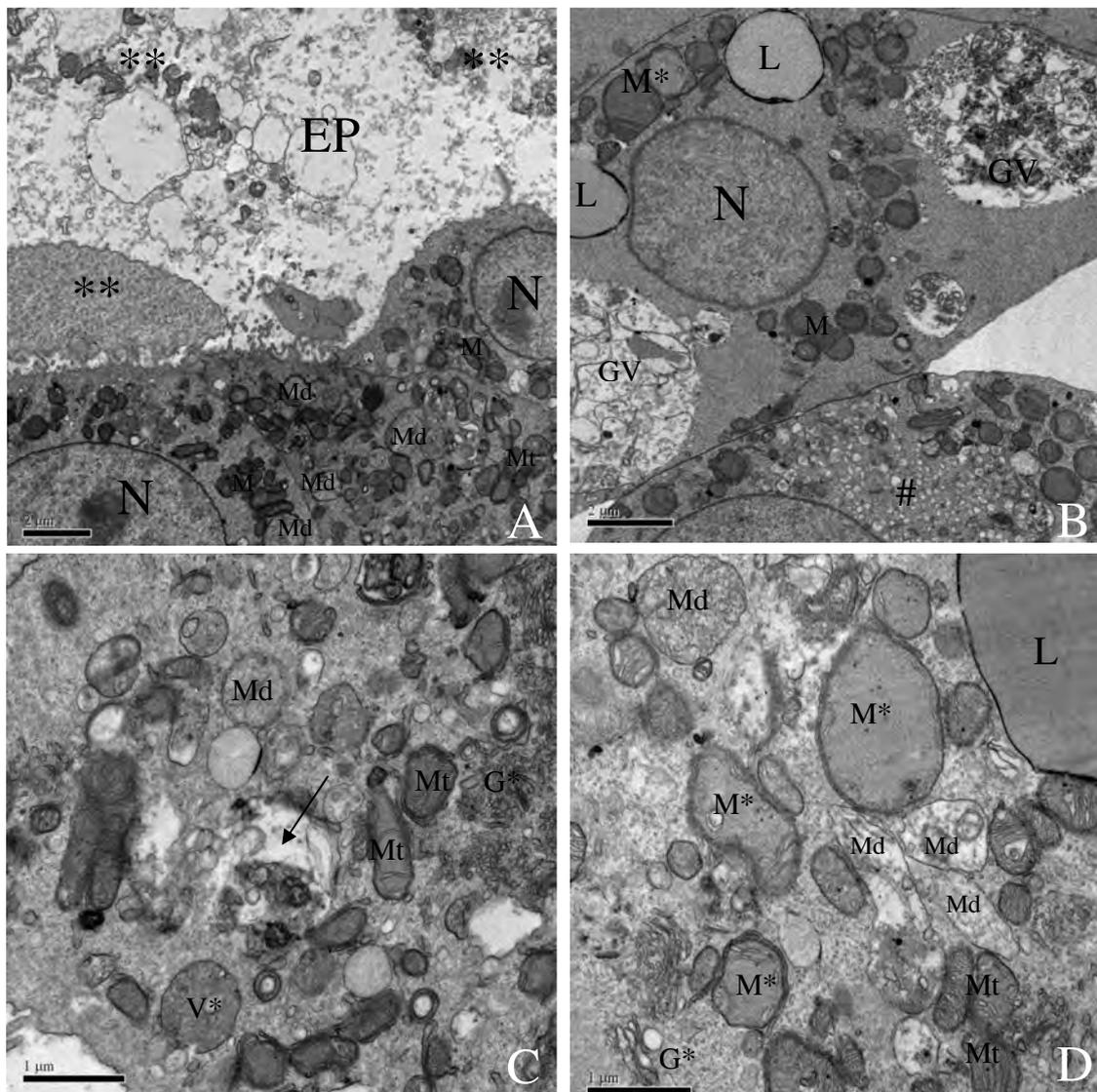


Figura 13. Embriões congelados/descongelados avaliados em microscopia eletrônica de transmissão. A) mórula de grau III com grande quantidade de debris no EP, com restos celulares (**), diversas mitocôndrias degeneradas (Md) e citoplasma heterogêneo. B) blastocisto de grau III com grandes vesículas de digestão (GV), mitocôndrias com intensa turgidez (M*) e citoplasma vesiculado (#). C, D) mórula de grau III com mitocôndrias intensamente túrgidas (M*) e degeneradas (Md), vesícula rompida (V*), descontinuidade citoplasmática (seta), complexo Golgi fora da região perinuclear (G*) e granulação citoplasmática. N: núcleo, Mt: mitocôndria normal, EP: espaço perivitelínico.

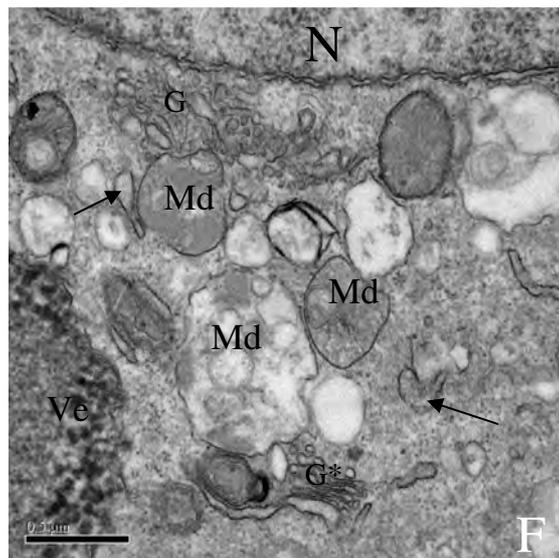
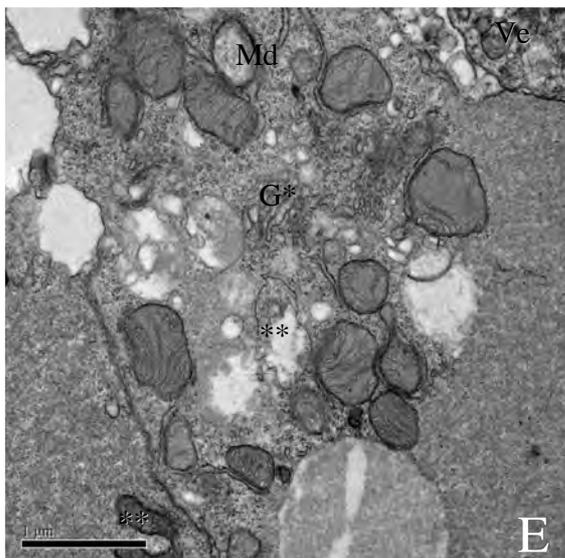
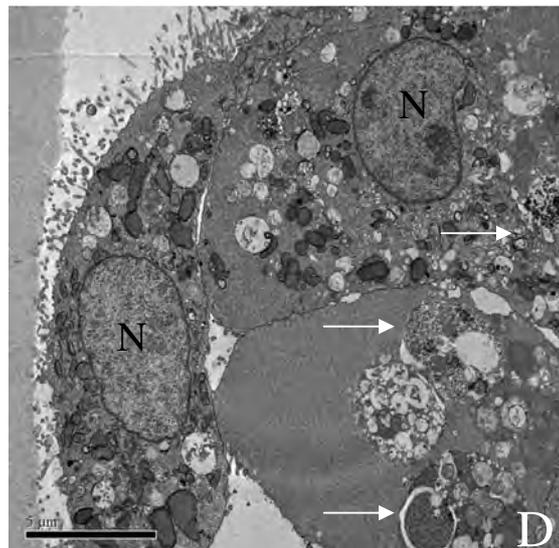
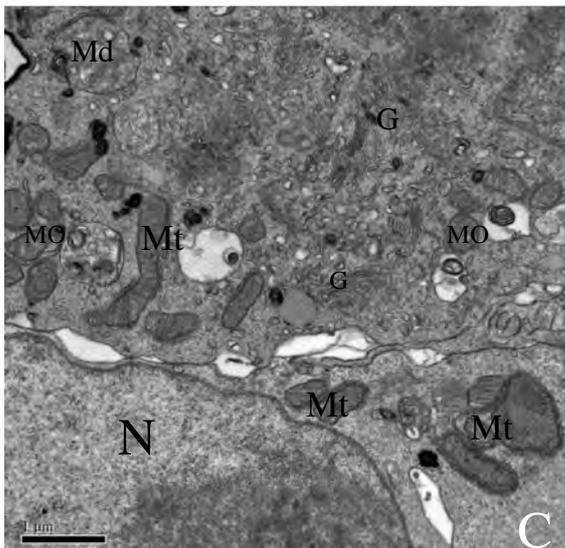
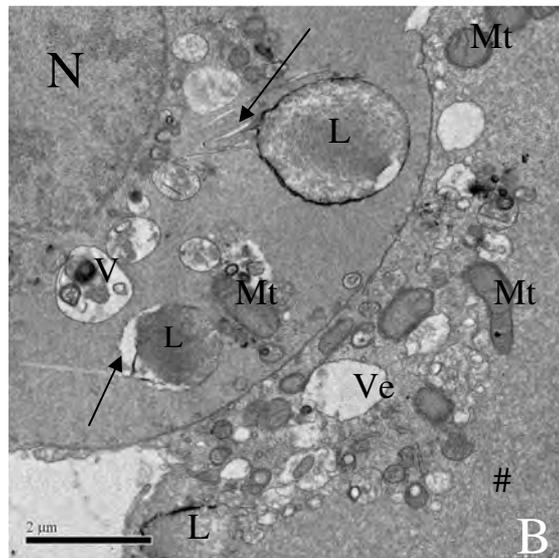
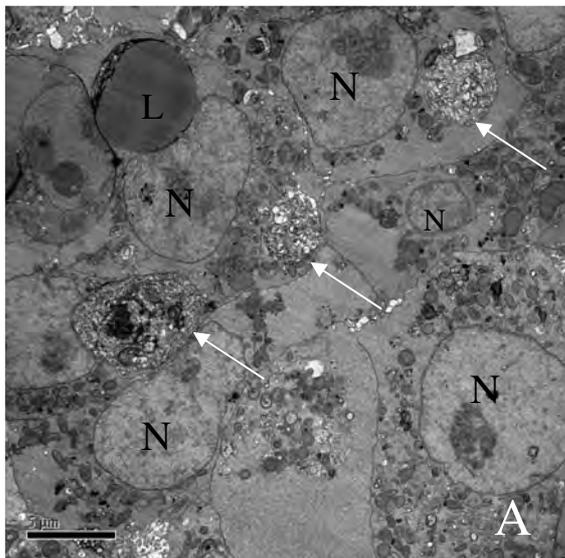


Figura 14. Embriões vitrificados/aquecidos avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. A) mórula de grau II com presença de grandes vesículas de digestão em vários blastômeros (seta branca). B) mórula de grau I apresentando menor número de vesículas, espaço citoplasmático vazio (#), descontinuidade citoplasmática (seta preta), especialmente próxima à gota lipídica (L). C) Mórula de grau II com área de grande concentração de organelas, presença de mitocôndrias alongadas (Mt), ovais (MO) e pleomórficas. D) blastocisto de grau III com vesículas de digestão (seta branca) ocupando quase todo o citoplasma. E, F) blastocisto de grau III com presença de mitocôndrias degeneradas (Md) e rompidas (**), complexo de Golgi fora da região perinuclear (G*), vesículas de digestão (Ve), retículo endoplasmático liso túrgido (seta) e complexo de Golgi (G).

4 DISCUSSÃO

Estudos atuais sobre ultraestrutura de embriões ovinos produzidos *in vivo* criopreservados se referem à comparação de diferentes crioprotetores na congelação lenta (Cocero et al., 2002) e a comparação desta técnica com a vitrificação em OPS (Bittencourt et al., 2009a). Trabalhos que envolvam a avaliação da atividade mitocondrial e organização do citoesqueleto após criopreservação são inéditos para esta espécie. O presente trabalho estuda, através da marcação do padrão de atividade mitocondrial e organização dos filamentos de actina, sua relação com as características ultraestruturais presentes em embriões ovinos produzidos *in vivo* submetidos à congelação lenta ou vitrificação em OPS em uma hora após reaquecimento.

A avaliação do padrão de atividade mitocondrial pelo uso da microscopia confocal de varredura a laser revelou intensa marcação no grupo controle. Mitocôndrias ativas estavam distribuídas por todo o citoplasma, independente do estágio de desenvolvimento do embrião. Contudo, embriões criopreservados não apresentaram tal marcação. De acordo com Leoni et al. (2003) embriões pós criopreservação necessitam de um período para restaurar seu metabolismo biológico, que foi alterado em função da queda de temperatura. Tendo em vista que o fluorocromo utilizado neste experimento tem penetração proporcional à atividade e ao equilíbrio de potencial de membrana interna mitocondrial (Macho et al., 1996), o período de uma hora de CIV provavelmente não foi suficiente para a total recuperação metabólica, levando ao prejuízo na detecção do fluorocromo tanto no grupo congelado quanto no vitrificado.

Ao comparar a ultraestrutura mitocondrial de embriões frescos com os criopreservados, houve maior frequência de mitocôndrias túrgidas e degeneradas nos grupos

tratados de grau I, II e III, sendo proporcional à qualidade embrionária no estereomicroscópio (isto é, quanto melhor sua qualidade, menor a frequência de degeneração). Contudo, grande parte das mitocôndrias dos embriões de grau I e II possuíam ultraestrutura normal. Trabalhos anteriores com embriões ovinos reaquecidos de grau I e II encontraram maior grau de turgidez mitocondrial em comparação ao presente estudo (Cocero et al., 2002; Bettencourt et al., 2009a). Outro trabalho em particular, ao inovular embriões após mesmo procedimento de congelamento lento e vitrificação, atingiu índices satisfatórios de 68,4% e 54,6% de prenhez aos 45 dias, respectivamente (Bettencourt et al., 2009b). Isso mostra que certas alterações ultraestruturais de embriões transferíveis após procedimento de criopreservação são restauradas, possibilitando a recuperação das células embrionárias.

Outro fator relevante é que a interrupção do potencial de membrana mitocondrial que precede um processo apoptótico geralmente é acompanhada por alterações nucleares (Macho et al., 1996). No entanto, ao comparar achados ultraestruturais do presente estudo com trabalhos anteriores, associado à rara visualização de alterações nucleares, é possível concluir que o potencial de membrana mitocondrial é restabelecido à medida que o embrião tem seu metabolismo restaurado e não necessariamente evoluirá para morte celular. Estes embriões pós criopreservação teriam somente uma deficiência de metabolização energética, já que o potencial de membrana interna mitocondrial é altamente correlacionado com a produção de ATP (Bavisterx & Squirrell, 2000; Coppola et al., 2009), contudo, esta condição parece ser temporária e reversível.

Os filamentos de actina, além de desenvolverem importante papel na organização estrutural de organelas, têm como função primária sua associação às junções intercelulares durante o processo de compactação, além de manter a integridade estrutural do embrião em sua fase inicial (Gallicano, 2001). Contudo, trabalhos envolvendo sua caracterização no desenvolvimento de células embrionárias são escassos. A organização diferenciada dos filamentos de actina na fase de transição de mórulas para blastocisto inicial é justificada pela divisão assimétrica, polarização e diferenciação das células da MCI e trofoblasto (Louvet-Vallée et al., 2001). Há uma grande reorganização do citoesqueleto nesta fase de transição, em que as junções celulares se intensificam, células da MCI formam prolongamentos e se distanciam, enquanto que as do trofoblasto se alongam, aumentam as

microvilosidades e suas organelas se dispõem periféricamente ao embrião para iniciar e regular a implantação (Gallicano, 2001).

Por consistir de uma frágil rede de microfilamentos e microtúbulos, o citoesqueleto de embriões mamíferos pode ser lesionado durante o processo de criopreservação e reaquecimento (Dobrinsky et al., 2000). Apesar de não ser letal, é necessário que o embrião possua condições para a recuperação do citoesqueleto e de sua arquitetura celular, pois tais danos prejudicam diversas funções, dentre elas a divisão celular, que pode ser fatal ao embrião (Wang et al., 2000). No presente estudo os achados quanto ao citoesqueleto de embriões frescos foram os esperados e caracterizados por boa arquitetura, quando localizado nas porções embrionárias viáveis (Tharasanit et al., 2005; Zijlstra et al., 2008; Skidmore et al., 2009).

Embriões criopreservados foram caracterizados por leve a acentuada desorganização dos filamentos de actina. Quanto melhor a qualidade embrionária classificada no estereomicroscópio (grau I e II), menor foi o dano ao citoesqueleto. Embriões criopreservados de grau III apresentaram alto grau de desorganização do citoesqueleto, independente do tratamento de criopreservação. Contudo, ao se avaliar blastocistos de grau I que tiveram aparente recuperação da blastocele após o processo de vitrificação e reaquecimento, foram encontrados diversos pontos de descontinuidade nos filamentos de actina, característica ausente no grupo congelado. De acordo com Skidmore et al. (2009), a congelamento lenta possibilita obter melhor grau de preservação do citoesqueleto ao se comparar com a vitrificação, procedimento este que resultaria em maior probabilidade de choque osmótico em embriões de maior tamanho (Eldridge-Panuska et al., 2005; Skidmore et al., 2005). Além disso, a presença de crioprotetores permeáveis, que estão em altas concentrações nas soluções de vitrificação, influenciam a organização do citoesqueleto pela interação e despolimerização dos filamentos de actina, que irá variar de acordo com a fase de desenvolvimento embrionário, sendo mais suscetível a alterações em fase de compactação e início de formação da blastocele (Dobrinsky, 1996).

Alterações ultraestruturais decorrentes da desorganização dos filamentos de actina foram observadas em embriões criopreservados no presente estudo, como: áreas citoplasmáticas livres de organelas, complexo de Golgi localizado distante do núcleo e

diminuição da frequência de junções intercelulares especializadas, abundantes em blastocistos frescos, principalmente em blastocistos expandidos.

Injúrias ligadas ao choque osmótico decorrente da vitrificação ou a formação de gelo intracelular resultante do processo de congelação lenta, teriam como principais consequências a ruptura de membrana celular e de organelas (Vajta & Kuwayama, 2006), contudo, tal achado não foi frequente neste estudo. Dentre alterações observadas nos dois grupos criopreservados está a descontinuidade citoplasmática, principalmente na periferia de gotas lipídicas. Este achado não é descrito em trabalhos anteriores como alteração decorrente da criopreservação, no entanto, não foi encontrado no grupo controle e pode ser consequência das alterações celulares decorrentes de efeitos osmóticos da exposição aos crioprotetores e rehidratação ou ainda pela formação de cristais de gelo intracelular. O fato de não haver membrana plasmática entre a gota lipídica e o citoplasma, além do efeito de “empacotamento” e encurtamento das longas cadeias de ácidos graxo saturados em baixas temperaturas (Graziola et al., 2002) pode conferir uma região de maior fragilidade neste local, propiciando esta descontinuidade.

Entre os três grupos deste experimento, foram encontradas ainda algumas diferenças ultraestruturais de ribossomo e retículo endoplasmático, organelas ligadas diretamente à síntese proteica. Em embriões frescos os ribossomos se tornaram bastante frequentes durante a fase de blastocisto, demonstrando a maior intensidade na produção de proteínas a partir deste estágio (Leoni et al., 2003). Retículo endoplasmático com intensa relação de proximidade com mitocôndrias foi bastante comum em todas as fases de desenvolvimento embrionário. Nos grupos criopreservados houve a manutenção da aproximação entre mitocôndria e retículo endoplasmático, contudo, foi observada menor concentração de ribossomos nos blastocistos expandidos após o tratamento. A exposição aos crioprotetores, além da supressão metabólica causada pela queda de temperatura, leva a consequências indiretas decorrentes de injúrias bioquímicas que podem resultar de interações específicas entre o crioprotetor e proteínas, lipídeos ou DNA. De acordo com Leoni et al. (2003) embriões ovinos vitrificados recuperam completamente sua capacidade de síntese de DNA após 12 horas de CIV, readquirindo sua atividade de secreção proteica normal somente após 29 a 35 horas, o que poderia justificar a menor concentração citoplasmática de ribossomos na primeira hora após reaquecimento.

No grupo vitrificado houve ainda a observação de grandes vesículas de digestão ocupando quase a totalidade do citoplasma e maior ocorrência de células degeneradas entre células da porção embrionária viável. A presença de grandes vesículas de digestão nos embriões vitrificados pode indicar que esta técnica acarreta maiores danos sobre os embriões, que necessitariam de melhores artifícios para sua recuperação após aquecimento. Vajta et al. (1997), ao estudar a recuperação de embriões bovinos vitrificados/aquecidos após 0, 4 e 24 horas de CIV, também encontraram células degeneradas em meio a porção embrionária viável, contudo, essas células inviáveis acabaram sendo expulsas para a região da blastocele em um desenvolvimento posterior e, ao final de 24 horas, a morfologia embrionária era semelhante à normal, exceto pela maior quantidade de debris no espaço perivitelínico.

A avaliação embrionária dos cortes semifinos observados em microscopia de luz, comumente revela danos estruturais não detectados pela estereomicroscopia (Cuello et al., 2007; Bettencourt et al., 2009a). A análise estrutural de embriões de grau I e II deste experimento revelou pequenas diferenças entre os grupos tratados e controle. A irregular distribuição de organelas e vesículas, o maior espaço perivitelínico dos blastocistos, bem como maior quantidade de debris neste local e leve colabamento da blastocele foram características de todos os embriões de grau I e II pós-criopreservação avaliados na microscopia de luz. Corroborando com estudos anteriores (Cuello et al., 2007; Bettencourt et al., 2009a), embriões de grau III mostram completa desorganização da blastocele, grande quantidade de células extrusas e formato irregular tanto no grupo controle quanto no tratado. De acordo com Berthelot et al. (2007) e Cuello et al. (2005), o embrião não é capaz de se reorganizar em uma hora após reaquecimento, sendo que a blastocele se re-expande totalmente somente em torno de 8 a 16 horas após aquecimento (Leoni et al., 2008), período em que o embrião já estaria no útero quando inovulado.

A avaliação por estereomicroscopia após o reaquecimento dos embriões mostrou que o número de embriões vitrificados que mantiveram a qualidade foi maior do que o de embriões congelados. No entanto, o número de embriões degenerados também foi maior, resultando em uma taxa de embriões transferíveis menor que no grupo congelado. Entretanto, estas diferenças não foram significativas. A única diferença significativa observada foi no número de embriões que diminuíram de qualidade após a criopreservação, sendo maior no grupo congelado. Correlacionando estes resultados com os achados das demais avaliações

realizadas, a avaliação por estereomicroscopia se mostrou eficaz. Contudo, nas condições deste estudo não é possível determinar qual técnica de criopreservação proporciona melhor resultado.

5 CONCLUSÕES

Este estudo apresentou a estrutura do citoesqueleto, padrão de atividade mitocondrial e ultraestrutura de embriões ovinos em diferentes estágios de desenvolvimento. A fase de transição entre compactação e início da blastulação apresenta um citoesqueleto com projeções, levando a uma conformação diferenciada em relação às demais fases de desenvolvimento embrionário. O padrão de atividade mitocondrial se mostrou semelhante em todas as fases de desenvolvimento.

Alterações do citoesqueleto após criopreservação foram proporcionais à qualidade dos embriões classificados em esteromicroscópio, apresentando uma relação com a ultraestrutura após criopreservação. Mesmo sem apresentar marcação de atividade mitocondrial, embriões criopreservados transferíveis continham maior proporção de mitocôndrias com ultraestrutura normal, além de boa preservação nuclear e de membrana plasmática. Embriões vitrificados foram marcados por sua ultraestrutura com grandes vesículas de digestão logo na primeira hora após reaquecimento.

No presente estudo, embriões classificados como grau I ou II na estereomicroscopia revelaram alterações ultraestruturais leves, deixando claro que esta ferramenta se mostra eficaz para a classificação após criopreservação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenology**, v. 57, p. 1273-1283, 2002.
- ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. Análise das estruturas das células ao microscópio, 547-580. In: **Biologia Molecular da Célula**, 4ª. edição, Artmed editora S.A., Porto Alegre, RS, Brasil, 1463p., 2004.
- ALBERTS, B; BRAY, D; HOPKIN, K; JOHNSON, A; LEWIS, J; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2ª. edição, Artmed editora S.A., Porto Alegre, RS, Brasil, 866p, 2006.
- ALENCAR, L; ROSA, F., R., T. Ovinos: panorama e mercado. **Revista O Berro**. v. 96, p. 82-85, novembro/2006.
- ALI, J. & SHELTON, J. Degering of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 471-477, 1993a.
- ALI, J. & SHELTON, J. Successful vitrification of day-6 sheep embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 65-70, 1993b.
- BARIL, G; TRALDI, A.L; COGNIÉ, Y; LEBEOUF, B; BECKERS, J.F; MERMILLOD, P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**, v. 56, p. 299-305, 2001.
- BAVISTERX, B. D & SQUIRRELL, J. M. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. **Human Reproduction**, v. 15, suppl. 2, p. 189-198, 2000.

- BERTHELOT, F; VENTURI, E; COGNIE, J; FURSTOSS, V; MARTINAT-BOTTÉ, F. Development of OPS vitrified pig blastocysts: Effects of size of the collected blastocysts, cryoprotectant concentration used for vitrification and number of blastocysts transferred. *Theriogenology*, vol. 68, p. 178–185, 2007.
- BETTENCOURT, E. M. V; BETTENCOURT, C. M; SILVA, J. N. C. E; FERREIRA, P; MATOS, C. P; OLIVEIRA, E; ROMÃO, R. J; ROCHA, A; SOUSA, M. Ultrastructural characterization of fresh and cryopreserved in vivo produced ovine embryos. *Theriogenology*, v. 71, p. 947-958, 2009a.
- BETTENCOURT, E. M; BETTENCOURT, C. M; SILVA, J. C; FERREIRA, P; MATOS, C. P; ROMÃO, R. J; ROCHA, A. Fertility rates following the transfer of ovine embryos cryopreserved using three protocols. *Small Ruminant Research*, v. 82, Issue 2-3, p. 112-116, 2009b.
- 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, 24 p., 2001.
- COCERO, M.J; LOPEZ SEBASTIAN, A; BARRAGAN, M.L; PICAZO, R.A. Differences on Post-thawing Survival between Ovine Morulae and Blastocysts Cryopreserved with Ethylene Glycol or Glycerol. *Cryobiology*, vol.33, p. 502–507, 1996.
- COCERO, M.J; MORENO DÍAZ DE LA ESPINADA, S; AGUILAR, B. Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 1244-1259, 2002.
- COGNIÉ, Y; BARIL, G; POULIN, N; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v. 59, p. 171-188, 2003.
- COPPOLA, M.W.W.G; DALE, B; MATTEO,L. Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction Review*, p. 1741–7899, versão on line: www.reproduction-online.org, DOI: 10.1530/REP-08-0444, 2009.
- CUELLO, C; BERTHELOT, F; MARTINAT-BOTTE; VENTURI, E; VAZQUEZ, J. M; ROCA, J. Piglets born after non-surgical deep intrauterine transfer of vitrified blastocysts in gilts. *Animals Reproduction Science*, v. 85, p. 275–86, 2005.
- CUELLO, C.; BERTHELOT, F.; DELALEU, B.; VENTURI, E.; PASTOR, L. M.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; MARTINAT-BOTTE, F.; MARTINEZ, E. A. The effectiveness of the stereomicroscopic evaluation of embryo quality in vitrified–warmed porcine blastocysts: An ultrastructural and cell death study *Theriogenology*, v. 67, p. 970–982, 2007.
- 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; ACCARDOA, C; PILICHIA, S; ISACHENKOB, V; MARAA, L; CHESSAC, B; CAPPAL, P. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. **Theriogenology**, v. 62, p. 481-493, 2004.
- DINNYES, A; MENG, Q; POLGA, Z; BOONKUSO, D; SOMFAI, T. Criopreservação de embriões de mamíferos. XX Reunião Anual da SBTE, **Acta Scientiae Veterinariae**, 34, supl. 1, 2006.
- DOBRINSKY, J. R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v. 45, p. 17-26, 1996.
- DOBRINSKY, J. R; PURSEL, V. G; LONG, C. R; JOHNSON, L. A. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 564-570, 2000.
- ELDRIDGE-PANUSKA, W. D; CARACCILO DI BRIENZAB, V; SEIDEL JR. G. E; SQUIRES, E. L; CARNEVALE, E. M. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer of vitrified equine embryos. **Theriogenology**, v. 63, p. 1308-1319, 2005.
- EL-GAYAR, M; HOLTZ, W. Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 2436-2438, 2001.
- ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v 47, p 243-255, 1993.
- FERRER, F.; GARCÍA, C.; VILLAR, J.; ARIAS, M. Ultrastructural study of the early development of the sheep embryo. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 24, p. 191-196, 1995.
- FUCHINOUE, K; FUKUNAGA, N; CHIBA, S; NAKAJO, Y; YAJI, A; KIONO, K. Freezing of human immature oocytes using cryoloops with Taxol in the vitrification solution. **Journal Assisted Reproduction Genetics**, vol. 21, p. 307-309, 2004.
- GALLICANO, G. I. Composition, regulation and function of the cytoskeletal in mammalian eggs and embryos. **Frontiers in Bioscience** 6, d1089-1108, Sept. 1, 2001.
- GARCIA-GARCIA, M.R.; GONZALEZ-BULNES, A.; DOMINGUEZ, V.; VEIGA-LOPES, 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; VEIGA-LOPES, A; COCERO, M.J. Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. **Cryobiology**, v. 55, p. 108-113, 2006.

- GEORGE, E & SEIDEL, J. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**, v. 65, p. 228–235, 2006.
- GRAZIOLA, S; SOLIS, Z. S; CURI, R. Entendendo a gordura – os ácidos graxos. In: **Estrutura química e classificação dos ácidos graxos**. Ed. Maloli LTDA, p. 7-23, 2002.
- GREEN, R. E. **Viabilidade de embriões ovinos vitrificados ou congelados submetidos às técnicas direta e indireta de inovulação**. Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, julho, 2007.
- GUIGNOT, F; BOUTTIER, A; BARIL, G; SALVETTI, P; PIGNON, P; BECKER, J.F; TOUZE, J.L; COGNIE, J; TRALDI, A.S; COGNIE, Y; MERMILLOD, P. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. **Theriogenology**, vol. 66, p.1004–1011, 2006.
- 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**, vol. 59, p. 1209-1218, 2003.
- JIN, B; KUSANAGI, K; UEDA, M; SEKI, S; VALDEZ JR, 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. xytex corporation, Augusta, Georgia, USA, 2001. Disponível em: www.xytex.com/cryobiology%20001%20-%20.pdf, acessado em 28/07/2009.
- KONG, I.K; LEE, S; CHO, S.G; CHO, S.K; PARK, C.S. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology**, vol. 53, p. 1817-1826, 2000.
- KUWAYAMA, M; VAJTA, G; IEDA, S; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproduction Biomed Online**, vol, 11, p. 608-614, 2005.
- KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The cryotop method. **Theriogenology**, vol. 67, p. 73-80, 2007.

- LANE, M; SCHOOLCRAFT, W. B; GARDNER, D. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and Sterility**, v.72, p.1073–1078, 1999.
- LEIBO, S. P; DEVERIDDY, R. Effect of chilling on gametes and embryos. **Cryobiology**, vol. 55, Issue 3p. 324-378, 2007.
- LEIBO, S. P; Cryopreservation of oocytes and embryos: Optimization by theoretical versus empirical analysis. **Theriogenology**, vol. 69, p. 37-47, 2008.
- LEONI, G; BERLINGUER, F; ROSATI, I; BOGLIOLO, L; LEDDA, S; NAITANA, S. Resumption of metabolic activity of vitrified/warmed ovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 207–213, 2003.
- LEONI, G.G; BERLINGUER, F; SUCCU, S; BEBBERE, D; MOSSA, F; MADEDDU, M; LEDDA, S; BOGLIOLO, L; NAITANA, S. A New Selection Criterion to Assess Good Quality Ovine Blastocysts After Vitrification and to Predict Their Transfer Into Recipients. **Molecular Reproduction And Development**, v. 75, p. 373–382, 2008.
- LOUVET-VALLÉE, S; DARD, N; SANTA-MARIA, A; AGHION, J; MARO, B. A Major Posttranslational Modification of Ezrin Takes Place during Epithelial Differentiation in the Early Mouse Embryo. *Development Biology*, v. 231, p. 190–200, 2001.
- MACHO, A; DECAUDIN, D; CASTEDO, M; HIRSCH, T; SUSIN, S. A; ZAMZAMT, N; KMEMER, G. Chloromethyl-x-rosamine is an aldehyde-fixable potential-sensitive fluorochrome for the detection of early apoptosis. **Cytometry**, v. 25, p. 333-340, 1996.
- MARTINS, E. C; GARAGORRY, F. L; FILHO, H. C. Evolução da Ovinocultura Brasileira no Período de 1975 a 2003. Comunicado Técnico 67 – Embrapa, Sobral, CE, dezembro, 2006.
- MARTINEZ, A. G.; MATKOVIC, M. Cryopreservation of ovine embryos: solw freezing and vitrification. **Theriogenology**, v. 49, p. 1039-1049, 1997.
- MARTINEZ, A.G; VALCÁRCEL, A; De Las 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**, vol. 73, p.11–21, 2002.
- MARTINEZ, A.G; VALCÁRCEL, A; FURNUS, C.C; De MATOS, D.G; IORIO, G; De La HERAS, M.A. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. **Small Ruminant Research**, vol. 63, p. 288–296, 2006.
- MARTINO, A; SONGSASEN, N; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biological Reproduction**, vol. 56, p. 1059-1069, 1996.

- MASSIP, A. Cryopreservation of embryo of farm animals. **Domestic Animal**, v.36, p.49-55, 2001.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Physiological Society**, p.125-142, 1984.
- McGINNIS, L. K.; DUPLANTIS, S. C.; YOUNGS, C. R. Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. **Animal Reproduction Science**, 30, p. 273-280, 1993.
- 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 (8), p. 1551-1562, 2006.
- 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.
- PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**, Presented at the International Consensus Meeting “New Horizons in Cell and Tissue banking” on May at 2007 at Vale de Santerém, Portugal (Review Paper), 2008.
- PINHEIRO, A. A. Biotécnicas da reprodução e o impacto na produção de caprinos e ovinos. In: Seminário Nordestino de Pecuária – PECNORDESTE, VI, **Anais**, 2002, Fortaleza, p. 61 – 82, 2002.
- POLLARD, J. W; LEIBO, S. P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 41, p. 101-106, 1994.
- RALL, W. F; FAHY, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at – 196°C by vitrification. **Nature**, v.24, p.387-402, 1985.
- 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 PB, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal, São Paulo: Varela, p.127-178, 2002.
- ROBERTSON, I; NELSON, R. Certificação e identificação de embriões. STRINGFELLOW, D. A; SEIDEL, S. M. In: Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3.ed. Illinois: IETS, 1998. 180p.

- SMITH, L. C. Membrane and intracellular effects of ultraviolet irradiation with Hoechst 33342 on bovine secondary oocytes matured in vitro. **Journal of Reproduction and fertility**, v. 99, p. 39-44, 1993.
- SKIDMORE, J. A; BILLAH, M; LOSKUTOFF, N. M. Comparison of two different methods for the vitrification of hatched blastocysts from the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Reproduction Fertility and Development**. V. 17, p. 523–527, 2005.
- SKIDMORE, J.A; SCHOEVERS, E; STOUT, T.A.E. Effect of different methods of cryopreservation on the cytoskeletal integrity of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 196-204, 2009.
- 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.
- THARASANIT, T; COLENBRANDER, B; STOUT, T. A. E. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. **Reproduction Research**, v. 129, p. 789-798, 2005.
- TVEDEN-NYBORG, P; PEURA, T. T.; HARTWICH, K. M; WALKER, S. K; MADDOX-HYTTEL, P. Morphological characterization of pre and peri-implantation in vitro cultured, somatic cell nuclear transfer and in vivo derived ovine embryos. **Society for Reproduction and Fertility**, ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899 (online), 2005, www.reproduction-online.org, acesso em 20/08/2009.
- TRALDI, A.S.; LEBOEUF, B.; COGNIÉ, Y.; POULIN, N. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. **Theriogenology**, p. 175, 1996.
- YAVIN, S; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. **Theriogenology**, v. 67, p. 81-89, 2007.
- VAJTA, G; HYTTEL, P; CALLESEN, H. Morphological Changes of In-Vitro-Produced Bovine Blastocysts After Vitrification, In-Straw Direct Rehydration, and Culture. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, p. 9–17, 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. **Molecular Reproduction Development**, v. 51, p. 53-58, 1998.
- VAJTA, G; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservations 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. **Reproductive BioMedicine Online**, vol. 12, No. 6, p. 779-796, 2006.
- WANG, W. H; ABEYDEERA, L. R; PRATHER, R. S; DAY, B. N. Actin filament distribution in blocked and developing pig embryos. **Zygote**, v. 8, p. 353-358, 2000.
- WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v.233, p.125, 1971.
- WILLADSEN, S.M; POLGE, C; ROWSON, L.E.A; MOOR, R.M. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. **Cryobiology**, v. 11, p. 560, 1974.
- WOODS, E. J; BENSON, J. D; AGCA, Y; CRITSER, J. K. Fundamental cryobiology of reproductivel cells and tissues. **Cryobiology**, v.48, p.146-156, 2004.
- WUSTEMAN, M; ROBINSON, M; PEGG, D. Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some pproaches to their solution. **Cryobiology**, vol. 48, p. 179-189, 2004.
- ZERON, Y; PEARL, M; BOROCHOV, A; ARAV, A. Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes. **Cryobiology**, vol. 38, p. 35-42, 1999.
- ZIJLSTRA, C; KIDSON, A; SCHOEVERS, E. J; DAEMEN, A. J. J. M; THARASANIT, T; KUIJK, E. W; HAZELEGER, W; DUCRO-STEVERINK, D. W. B; COLENBRANDER, B; ROELEN, A. B. J. Blastocyst morphology, actin cytoskeleton quality and chromosome content are correlated with embryo quality in the pig. **Theriogenology**, v. 70, p. 923–935, 2008.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ausência de marcação de atividade mitocondrial mostra que, para a mensuração de sua intensidade no processo de recuperação pós criopreservação, os embriões devem ser submetidos a um maior período de cultivo *in vitro*. Contudo, para comparar o impacto de diferentes técnicas de criopreservação na estrutura do citoesqueleto, o período de uma hora após reaquecimento foi suficiente.

Por se mostrar eficaz na classificação e seleção de embriões para posterior inovulação, a estereomicroscopia torna-se uma ferramenta essencial na prática de transferência e PIV de embriões. No entanto, embriões criopreservados por vitrificação mostraram maiores alterações ultraestruturais em comparação ao grupo congelado, pela necessidade de renovação celular ao gerar maior número de grandes vesículas de digestão.

Para se ter resultados mais completos sobre a recuperação do metabolismo pós-criopreservação de embriões ovinos são necessários mais estudos envolvendo maior período de CIV e/ou outros testes metabólicos específicos.