

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES OVINOS VITRIFICADOS OU  
CONGELADOS SUBMETIDOS ÀS TÉCNICAS DIRETA E  
INDIRETA DE INOVULAÇÃO**

**RENATA ELISA GREEN**

***BOTUCATU – SP***

***Julho - 2007***

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**VIABILIDADE DE EMBRIÕES OVINOS VITRIFICADOS OU  
CONGELADOS SUBMETIDOS ÀS TÉCNICAS DIRETA E INDIRETA  
DE INOVULAÇÃO**

**RENATA ELISA GREEN**

Dissertação apresentada junto ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Mestre

**Orientador: Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo**

***BOTUCATU – SP***

***Julho - 2007***

**RENATA ELISA GREEN**

Composição da Banca Examinadora:

Orientador: \_\_\_\_\_

Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo

Examinadores: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Adj. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

\_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Anneliese de Souza Traldi

BOTUCATU-SÃO PAULO

31 DE JULHO, 2007

## DEDICO

### Aos meus pais Jorge e Sonia

Vocês são meu exemplo de perseverança e vitória. Ensinaram-me muitos valores e me deram forças para eu continuar na minha caminhada. Dedico a vocês a minha conquista com mais profunda admiração e carinho.

Obrigada por vocês existirem e por serem quem são:  
mais que apenas pais biológicos.  
Obrigada pela dedicação, pela amizade, pelo companheirismo.  
Obrigada pela vida e pelo orgulho que é ter nascido de vocês.

Obrigada pelos ensinamentos,  
pelos sermões,  
pelos castigos,  
pelas palmadas  
e, principalmente pelos exemplos.  
Eles são valiosíssimos.

Obrigada pelos agrados e principalmente pelos desagradados.  
Assim, eu pude ver que na vida nem tudo é como a gente quer  
Aprendi a ter limites  
a ser mais “gente”.

Obrigada pelas preocupações  
sei que muitas vezes fui (e ainda sou)  
causa de inapetência e insônia.  
Obrigada pela caminhada,  
pela luta,  
pela lida.  
Aprendi com vocês  
A ter coragem,  
a não desanimar,  
a saborear a vitória.

Obrigada pelas mãos entrelaçadas na minha,  
doando-me confiança,  
na certeza de estar indo por caminhos seguros  
e na certeza de que terei sempre onde amparar  
caso eu tropece.

(Mena Moreira)

## **Ao amor de minha vida, Bruno**

Dedico a você meu amor que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. Você que me fez sorrir nos momentos difíceis, que me deu o ombro e carinho quando mais precisei. Agradeço por toda sua atenção, companheirismo, amor, dedicação e paciência. Digo que sou feliz hoje, pois você faz e sempre fará parte de minha vida.

## **Alma gêmea**

Viajando no tempo, espaços e dimensões,  
venho de lugares e de tempos longínquos.  
No agora deste momento tridimensional terreno,  
deparo-me com alguém singular,  
que veio igualmente  
de outros tantos caminhos existenciais  
e com inúmeras metas espirituais a cumprir,  
tais como as minhas programações dimensionais.  
Fixando-me em seu olhar,  
vislumbro sintonias do coração  
e uma ligação ímpar entre nós dois,  
nascida há inúmeras vidas  
e guardada de modo exclusivo em nossos corações,  
como uma senha,  
para um dia nos religar pelo amor.  
Temos, perceptivelmente, os mesmos ritmos de viver  
e de cumprir os nossos compromissos  
e idêntica capacidade de ser humano e de amar.  
Sei que a sua energia  
é a mesma que circunda o meu campo áurico.  
As nossas infindáveis viagens pelas vidas  
parecem, enfim, totalmente lógicas  
de explícitos e concretos sentidos,  
porque todos os caminhos foram traçados  
para nos conduzirem ao inevitável reencontro  
neste exato instante terreno.  
O meu coração me diz,  
que faria novamente todo o caminhar existencial  
ao longo dos renascimentos,  
quantas vezes fossem necessárias,  
se, ao final,  
em determinado momento da eterna existência,  
pudesse eu ver os seus olhos,  
tocar a sua energia  
e sentir que as nossas energias  
tornam-se uníssonas em total simetria.

(Moacir Sader)

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus

Aos meus irmãos queridos, Rafael, Denise e Daniel, que por toda vida estiveram ao meu lado, crescendo juntos e nos tornando uma família única. Agradeço pelos momentos de descontração e alegria que tivemos juntos durante estes anos. Pra vocês dedico esta minha nova etapa cumprida com uma filosofia que nos uniu mais ainda!

### **Filosofia do Sucesso**

Se você pensa que é um derrotado,  
você será derrotado.

Se não pensar, quero, intensamente,  
não conseguirá nada.

Mesmo que você queira vencer,  
Mas pensa que não vai conseguir,  
a vitória não sorrirá para você.

Se você fizer as coisas pela metade,  
você será um fracassado.

Nós descobrimos, neste mundo,  
que o sucesso começa pela intenção da gente  
e tudo se determina pelo nosso espírito.

Se você pensa que é um malgrado,  
você se torna como tal.

Se você almeja atingir uma posição mais  
elevada deve, antes de obter a vitória,  
dotar-se da convicção de que conseguirá  
infallivelmente.

A luta pela vida nem sempre é vantajosa  
aos fortes, nem aos espertos.  
Mais cedo ou mais tarde, que cativa a vitória  
é aquele que crê plenamente.

**EU CONSEGUIREI!**

(Napoleon Hill)

## AGRADECIMENTOS

Ao curso de Pós-graduação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu – SP e ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (RARV) pela oportunidade de aprimoramento técnico-científico e acadêmico.

Às pessoas que compõem a seção de Pós-graduação da FMVZ-UNESP-Botucatu-SP, Denise Aparecida Fioravante Garcia, Maria Aparecida Dias de Almeida Manoel e Maria Regina Forlin sempre gentilmente prontas a atender nossas solicitações.

Ao meu orientador Prof. Adj. Sony Dimas Bicudo, pela orientação, pelos ensinamentos, confiança e amizade.

À Prof. Adj. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, pela amizade, conselhos e dedicação.

Aos amigos Carmen e Franchesco Sicherle, pelas contribuições para a realização deste trabalho e pela amizade sincera.

À amiga Vanessa Bordignon Adorno, pela dedicação, amizade e paciência em todos os momentos.

À Prof. Kiky, pelo apoio e orientação em diferentes fases do trabalho, além da amizade e companheirismo.

À zootecnista *Adriana Piccinin*, pelo auxílio e dedicação estatística a este trabalho.

Ao funcionário da Fazenda Campo Verde José Elias Souza, pela dedicação e colaboração durante todo estes anos.

Aos amigos e padrinhos de casamento, Pablo Paiva e Priscilla Tanno, pela grande amizade e palavras de conforto durante estes anos.

Aos amigos Fernanda Carpi dos Santos e André Maciel Crespilho, pela ajuda e força durante os momentos mais adversos. Obrigada pela precisa colaboração e convivência.

À amiga Érika Visacre que apesar da distância sempre esteve ao meu lado, dando apoio e força durante estes anos.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente com meu mestrado.

Aos animais pela sua existência.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS .....	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	02
2.1. Criopreservação de Embriões Ovinos .....	02
2.2. Princípios Criobiológicos .....	04
2.3. Crioprotetores .....	05
2.4. Congelação Tradicional de Embriões Ovinos .....	07
2.5. Vitrificação de Embriões Ovinos .....	08
2.6. Aquecimento dos embriões .....	12
2.7. Fatores que afetam a eficiência da criopreservação de embriões .	13
2.7.1. Origem dos embriões .....	13
2.7.2. Estágio de desenvolvimento embrionário .....	13
3. OBJETIVOS .....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
4.1. Produção de embriões .....	17
4.2 Colheita de Embriões .....	17
4.3 Classificação dos Embriões .....	18
4.4 Criopreservação dos Embriões .....	19
4.4.1 Congelação tradicional.....	19
4.4.2 Vitrificação em OPS (Open Pulled Straw).....	21

<b>4.5 Aquecimento dos embriões .....</b>	<b>22</b>
4.5.1 <i>Descongelação de embriões congelados e rehidratação em placa (técnica indireta).....</i>	22
4.5.2 <i>Descongelação de embriões congelados e transferência direta (técnica direta).....</i>	23
4.5.3 <i>Aquecimento dos embriões vitrificados e rehidratação em placa (técnica indireta).....</i>	23
4.5.4 <i>Aquecimento dos embriões vitrificados e transferência direta (técnica direta).....</i>	23
<b>4.6 Inovulação dos Embriões e diagnóstico de gestação .....</b>	<b>25</b>
<b>4.7 Delineamento experimental .....</b>	<b>25</b>
<b>4.8 Análise estatística .....</b>	<b>26</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>27</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>7. CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES .....</b>	<b>35</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>36</b>
<b>9. ANEXO I .....</b>	<b>44</b>

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>μL</b>	microlitro;
<b>BSA</b>	albumina sérica bovina;
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido;
<b>g</b>	grama;
<b>Kg</b>	quilograma;
<b>M</b>	molar;
<b>mg</b>	miligrama;
<b>ml</b>	mililitro;
<b>OPS</b>	open pulled straw;
<b>PBS</b>	solução tamponada salina de Dulbecco;

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem;
°C	graus centígrados
>	maior;
<	menor;
=	igual;
+	mais / positivo;
-	menos / negativo;
®	marca registrada;
x	vezes / versus;

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> a) Esquema simplificado das passagens dos embriões pelos meios de congelamento. b) Esquema simplificado da preparação da palheta para a técnica de congelamento de embriões.....	<b>20</b>
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da técnica de vitrificação de embriões em OPS.....	<b>22</b>
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da técnica de aquecimento de embriões vitrificados em OPS para inovulação direta. a) Introdução da OPS na palheta francesa de 0,25 mL imediatamente após sua retirada do nitrogênio líquido. b) Retirada vagarosa da OPS após eliminação do embrião (3 seg). c) Palheta francesa de 0,25 mL preparada para inovulação nas receptoras (30 a 40 seg).....	<b>24</b>

## LISTA DE TABELAS

## Página

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos embriões inovulados segundo os tratamentos....	<b>26</b>
<b>Tabela 2.</b> Taxas de prenhez (%) após inovulação de embriões ovinos congelados, vitrificados ou a fresco.....	<b>27</b>
<b>Tabela 3.</b> Taxas de prenhez (%) após inovulação direta e indireta de embriões ovinos produzidos <i>in vivo</i> congelados ou vitrificados.....	<b>27</b>
<b>Tabela 4.</b> Taxa de prenhez (%) após inovulação de embriões ovinos congelados e vitrificados de acordo com o estadio de desenvolvimento embrionário.....	<b>28</b>

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi testar a viabilidade de embriões ovinos produzidos *in vivo* criopreservados pelo método de vitrificação em OPS (*Open Pulled Straw*) ou congelação tradicional, comparando dois métodos (direto e indireto) de transferência dos embriões pós-aquecimento. Ao mesmo tempo, foi avaliado o efeito da criopreservação em diferentes estadios de desenvolvimento embrionário. Um grupo de 137 embriões com qualidades boa ou excelente foram obtidos de ovelhas Ile de France superovuladas. Mórulas e blastocistos foram distribuídos em três grupos: embriões frescos (n=50), embriões congelados (n=44) e embriões vitrificados (n=43). Os embriões destinados ao congelamento foram primeiramente equilibrados em solução de etilenoglicol em três passos (0,5M, 1,0M e 1,5M) por 5 minutos em cada passo, e criopreservados em equipamento automático de congelação. Os embriões vitrificados foram equilibrados em solução de 10% EG e 10% DMSO por 1 minuto e 45 segundos e depois transferidos a solução de vitrificação com 20% EG e 20% DMSO por 30 segundos. Os embriões foram inovulados em receptoras sincrônicas, sendo utilizado dois métodos de transferência para os embriões criopreservados: direto e indireto. A viabilidade dos embriões foi determinada pela taxa de prenhez aos 30 dias através de ultra-sonografia em tempo real. A taxa de prenhez em receptoras inovuladas com embriões a fresco foi de 50%, sendo similar as taxas encontradas para embriões congelados (38,6%) e vitrificados (55,8%). No entanto, embriões vitrificados e inovulados pela técnica direta (57,1%) resultaram em maior taxa de gestação que os embriões congelados (34,8%) (P=0,07). Adicionalmente, embriões vitrificados mostraram maior viabilidade em estadio de mórula em relação aos embriões congelados no mesmo estadio (64,0% versus 38,9%) (P=0,07). Conclui-se que a vitrificação de embriões ovinos produzidos *in vivo* é uma biotécnica eficaz e viável em programas de transferência de embriões. Da mesma forma, a inovulação direta de embriões vitrificados e congelados mostraram ser efetivas quanto a taxa de gestação, sendo uma técnica facilmente aplicada em programas de TE a campo.

Palavras-chave: Criopreservação, vitrificação, embriões e ovinos.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the viability of sheep embryos cryopreserved using vitrification in OPS or traditional freezing after direct and indirect transfer. The effect of cryopreservation was evaluated on different embryos stage. A total of 137 in vivo produced sheep embryos, which were classified as good or excellent by morphological criteria, were obtained from adult Ile de France ewes. Morulae and blastocysts were distributed into three groups. In the first group, non-cryopreserved embryos were transfer to recipients as counterpart (n=50). In group 2, embryos were cryopreserved by slow freezing method (n=44). In the third group, embryos were vitrified using OPS (n=43). In a first set of experiments, embryos at morulae and blastocysts stage were frozen in an automatic freezer using three steps of equilibrium in ethylene glycol (0.5M, 1.0M and 1.5M) for 5 minutes in each step. A second group of embryos were loaded into open pulled straw (OPS) and plunged into liquid nitrogen after exposure at room temperature (20 °C) in 10% EG + 10% dimethyl sulphoxide (DMSO) for 1 minute and 45 seconds, then in 20% EG + 20% DMSO + 0.5 M sucrose for 30 seconds. The cryopreserved embryos were transferred directly and indirectly into synchronized recipients. Pregnancy rates were recorded 30 days after transfer. No significant difference was observed among fresh, frozen or vitrified embryos on pregnancy rate (50.0%, 38.6% and 55.8%). However, the pregnancy rate after direct transfer of OPS vitrified embryos was significantly higher than direct transfer of frozen embryos (57.1% versus 34.8%) (P=0.07). In the same way, early cleavage stage embryos vitrified (morulae) had higher viability than that frozen embryos (64.0% versus 38.9%) (P=0.07). In conclusion, our results indicate that the OPS vitrification technique in association with direct transfer improves the viability of sheep embryos with potential applications to field conditions.

Keywords: Cryopreservation; Vitrification; Embryo; Sheep

## 1. Introdução

A ovinocultura vem crescendo exponencialmente nas últimas décadas no Brasil, sendo considerada uma atividade com alto potencial produtivo e econômico, e que atualmente sofre mudanças significativas, sobretudo quanto aos aspectos de eficiência produtiva. Neste contexto, a exploração ovina deve enfatizar a organização e a gestão da atividade à luz do agronegócio, tendo o foco nas inovações tecnológicas produtivas e reprodutivas visando o incremento da rentabilidade dos rebanhos.

A Transferência de Embriões (TE) em ovinos vem sendo realizada a mais de 50 anos (WARWICK et al., 1934). Pesquisas sobre biotecnologias reprodutivas demonstram a crescente vantagem no uso destas técnicas para o aumento na produção (THIBIER & GUÉRIN, 2000). Sua grande importância para a produção animal consiste na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superiores ao que seria possível obter fisiologicamente durante a sua vida reprodutiva (BARI et al., 2003), favorecendo o teste de progênie com conseqüente resultado no melhoramento genético de raças.

Associado a este crescimento da atividade ovina e transferência de embriões está a importação e exportação de material genético, bem como a preservação de raças nativas brasileiras. Dessa forma, a criopreservação de germoplasma torna-se essencial para o desenvolvimento desta atividade econômica. Os protocolos de congelamento tradicional, que são os mais utilizados para criopreservação de embriões, requerem alto custo com equipamentos e dependem um maior tempo a serem realizados. O uso de técnicas de criopreservação ultra-rápidas, como a vitrificação, pode ajudar a diminuir os custos, pois não requer equipamentos especiais e pode ser adaptada facilmente a rotina de campo (BARIL et al., 2001). Como resultado, a vitrificação pode ser uma alternativa competitiva ao congelamento tradicional.

No Brasil escassos trabalhos de vitrificação de embriões ovinos foram publicados, sendo constatados resultados modestos. Em contrapartida, na literatura internacional podemos encontrar um número maior de trabalhos publicados, porém poucos utilizando a inovulação direta de embriões congelados e vitrificados. A inovulação direta de embriões criopreservados

pode nos trazer uma maior praticidade e simplicidade da técnica, possuindo vantagens ao trabalho a campo e no âmbito comercial.

## 2. Revisão de Literatura

### 2.1 Criopreservação de Embriões Ovinos

A criopreservação de embriões é amplamente utilizada em empresas de biotecnologia de animais domésticos permitindo o armazenamento de materiais biológicos por tempo indeterminado sem que estes percam a sua atividade funcional e sem que ocorra alteração genética (WHITTINGHAM, 1980).

A implementação da criopreservação de embriões favorece a importação e exportação de germoplasma, dispensando o transporte de animais e períodos de quarentena, o que significa redução nos custos do processo de aquisição de animais. Concomitantemente, a criopreservação fornece outras vantagens, como: a transferência de embriões para fêmeas em estro natural, sem a necessidade de sincronização artificial do estro e da ovulação da receptora; a preservação de embriões colhidos excedentes ao número de receptoras sincrônicas; a adequação da época de partos, independentemente da data da colheita dos embriões; a formação de bancos de germoplasma, objetivando a preservação de espécies ou raças ameaçadas de extinção ou de descaracterização; a comercialização, o transporte e a disseminação de material genético entre produtores, regiões e países, com o mínimo de risco de introdução e/ou disseminação de doenças, visto que os procedimentos laboratoriais e a própria criopreservação dos embriões promove a remoção e inativação de certos patógenos (SINGH, 1987; SHISONG & WRATHALL, 1989).

Desde 1976, quando o primeiro cordeiro nasceu através da transferência de embriões criopreservados, diversos estudos vêm demonstrando grande sucesso na criopreservação de embriões ovinos (SONGSASEN *et al.*, 1995; PAPADOPOULOS *et al.*, 2002; DATENNA, *et al.*, 2004; GARCIA-GARCIA, *et al.*, 2006). No Brasil os primeiros trabalhos sobre manipulação e criopreservação de embriões em ovinos foram executados na raça Corriedale por SELAIVE VILLARROEL *et al.* (1977) e por SELAIVE VILLARROEL & MIES FILHO (1979), abrindo-se novas perspectivas para a difusão desta biotecnologia da reprodução ovina no país.

Embora embriões ovinos tenham sido extensivamente usados como um modelo para o estudo da criopreservação de embriões em diversos países, os resultados ainda são limitados. As taxas de sucesso, baseadas no número de cordeiros nascidos por embriões congelados transferidos, são bastante variáveis (13%, TERVIT & GOOLD, 1984; 75%, DATENNA *et al.*, 2000; 72%, BARIL *et al.*, 2001). O sucesso na criopreservação de embriões está associado a diversos fatores, dentre eles a presença, combinações e quantidades de crioprotetores permeáveis, como glicerol, DMSO, etilenoglicol e propilenoglicol, além de crioprotetores não permeáveis como os açúcares (SONGSASEN *et al.*, 1995).

Os dois métodos de criopreservação mais amplamente utilizados são a congelação tradicional e a vitrificação. Ambos diferem pela concentração dos crioprotetores e pela velocidade de resfriamento. O congelamento tradicional mostra resultados aceitáveis quanto à taxa de gestação e de parição em ovinos (VAJTA, 2000). Entretanto, durante os últimos anos, a vitrificação de embriões vem sendo estudada com o objetivo de aprimorar os resultados obtidos no congelamento tradicional, além das vantagens de ser uma técnica simples, rápida e menos onerosa (BERTHELOT *et al.*, 2003; VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

Adicionalmente, podemos sugerir que a vitrificação pode ser considerada uma técnica mais eficiente, pois esta evita a formação de cristais de gelo intracelulares e extracelulares que são os responsáveis pelos danos nas membranas e organelas celulares. Esse processo é determinado pelo uso de crioprotetores de alta concentração e rápidas taxas de resfriamento e aquecimento (RALL, 1987; KASAI, 1996; MASSIP, 2001). Entretanto, as altas concentrações dos crioprotetores podem causar danos às células através do estresse osmótico e devido à toxicidade química (PAPADOPOULOS *et al.*, 2002). Para minimizar estes riscos, rápidas taxas de resfriamento são utilizadas para reduzir a toxicidade dos crioprotetores e diminuir o tempo de exposição da célula a temperaturas críticas (ARAV *et al.*, 1993).

## 2. 2 Princípios Criobiológicos

A criopreservação tem como objetivo manter o metabolismo celular em estado de quiescência, através do armazenamento em baixas temperaturas, induzindo a parada da atividade enzimática intracelular, do metabolismo e respiração celular, tornando possível a conservação de células e tecidos por tempo indeterminado (SEIDEL, 1986).

No processo de criopreservação, o princípio fundamental baseia-se na necessidade de remoção máxima de água das células antes de proceder a sua congelação. Se esta desidratação não ocorrer, grandes cristais de gelo se formarão resultando em diversos danos intracelulares (SEIDEL, 1986). Dessa forma, a congelação provoca um aumento da pressão osmótica na célula, devido a formação de cristais de gelo a partir da água pura, deixando a água entre os cristais com uma alta concentração de substâncias dissolvidas (NaCl e crioprotetor). Este líquido hiperosmótico atrai a água para fora das células embrionárias, tornando a água não congelada cada vez mais hiperosmótica (SEIDEL, 1996). Este processo de congelação provoca um aumento de pressão osmótica no embrião, uma vez que a concentração total de solutos dentro e fora devem estar sempre em equilíbrio. Em resposta a esse estresse, a água sai da célula e o soluto entra. O processo cessa quando a concentração de soluto se torna grande o bastante para prevenir futuras transformações de água em gelo (STOREY & STOREY, 1990).

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

suas propriedades físico-químicas (efeito solução), determinando a perda de viabilidade celular (BARIL *et al.*, 1995).

Devido ao fato do ponto de congelamento de um meio com crioprotetor ser abaixo do ponto de congelação da água, estas soluções podem sofrer um super-resfriamento a temperaturas abaixo de  $-20^{\circ}\text{C}$  sem a formação de gelo. Nestas condições a desidratação celular não ocorre adequadamente, e quando finalmente ocorre o congelamento, grandes cristais de gelo se formam dentro e fora do embrião. Este fenômeno pode ser evitado através da “indução da cristalização” ou “seeding”, isto é, a formação de gelo pré-congelamento, ao redor de  $-6^{\circ}\text{C}$ , que pode ser induzida pela adição de um pequeno cristal na amostra, ou provocando um contato entre a parte de fora do recipiente com um metal resfriado com nitrogênio líquido, ou pelo uso de ar frio sobre a superfície da amostra, ou ainda pelo uso de aparelhos que induzem a cristalização do gelo automaticamente (SEIDEL, 1996).

### 2.3 Crioprotetores

O fator fundamental para sobrevivência embrionária ao congelamento são os crioprotetores, pois estes têm a função de abaixar o ponto de congelação do meio, conferindo um maior tempo para remoção de água intracelular durante o resfriamento prévio a congelação da água. Além disso, os crioprotetores possuem a capacidade de proteção das estruturas celulares (PALASZ & MAPLETOFT, 1996).

Todos os métodos de criopreservação celular necessitam de crioprotetores que tem como função proteger as células e tecidos durante a criopreservação e descongelação. Os crioprotetores são divididos em duas categorias: (1) intracelulares, que são solutos orgânicos permeáveis responsáveis por proteger as organelas das células durante o resfriamento e o reaquecimento. Os mais comumente utilizados são o etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, metanol, etanol, etc. (2) extracelulares, que são as macromoléculas e açúcares não permeáveis cuja função é reduzir a formação de gelo, facilitar a desidratação das células e proteger a membrana celular. Os mais utilizados são a lactose, glicose, sacarose, polivinilpirrolidona

(PVP), manitol, trealose, galactose entre outros (NIEMANN, 1991; MASSIP, 2001).

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

Os crioprotetores mais comumente usados até o início da década de 90 foram o glicerol, DMSO e o propilenoglicol. O etilenoglicol foi utilizado pela primeira vez em 1977 por Miyamoto e Ishibashi, mostrando-se um crioprotetor mais permeável à célula embrionária devido a seu menor peso molecular, podendo desta forma, evitar a diluição em etapas com ou sem a sacarose (MASSIP, 2001). A baixa toxicidade do etilenoglicol foi demonstrada por Sommerfeld e Niemamm (1999) testando concentrações de 1,8 a 8,9 Molar.

As características fundamentais para um agente crioprotetor eficiente é o baixo peso molecular, a sua alta capacidade de atravessar a membrana celular e uma baixa toxicidade (KASAI *et al.*, 1996). Songsasen *et al.* (1995) compararam a permeabilidade entre os crioprotetores e demonstraram que o etilenoglicol é mais permeável à célula embrionária do que o propilenoglicol, e estes por sua vez, são mais permeáveis que o DMSO e o glicerol. Além disso, demonstraram uma melhor taxa de desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões ovinos criopreservados com etilenoglicol, demonstrando uma maior efetividade deste crioprotetor para o congelamento de embriões ovinos. Corroboram posteriormente estes resultados Martinez & Matkovic (1998). Martinez *et al.* (2006) mostraram melhores taxas de eclosão em embriões PIV congelados com etilenoglicol (40%) em relação ao glicerol (20%), devido a sua maior permeabilidade celular. Resultados similares foram encontrados por Cocero *et al.* (2002) em embriões produzidos *in vivo*.

As macromoléculas como sacarose e Ficoll (crioprotetores não permeáveis) conferem um efeito protetor adicional à célula criopreservada. Eles têm a função de desidratar a célula, reduzindo a formação de gelo intracelular (RALL, 1987; KASAI, 1996; MARTINEZ *et al.*, 2006). Durante o

aquecimento dos embriões, os açúcares não permeáveis evitam que um excesso de água entre na célula, reduzindo os danos causados na membrana, além do efeito de preservação estrutural e funcional da integridade das membranas (GUIGNOT et al., 2006). Adicionalmente, os crioprotetores extracelulares permitem a redução da concentração dos crioprotetores intracelulares, diminuindo a toxicidade celular. Diferentes estratégias são utilizadas para minimizar os danos osmóticos e tóxicos, através da aplicação de crioprotetores menos tóxicos, bem como a combinação de dois ou três crioprotetores (KASAI, 1996).

#### 2.4 Congelação Tradicional de Embriões Ovinos

Entre as metodologias utilizadas para criopreservação de embriões, predomina o processo lento conhecido como método de congelamento tradicional, no qual são necessárias, de uma a duas horas para que o embrião gradativamente passe da temperatura ambiente à de estocagem ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), passando por um processo de equilíbrio (VAJTA, 2000). A congelação lenta é um processo físico no qual as células embrionárias são desidratadas progressivamente através da ação de soluções crioprotetoras, provocando um decréscimo no ponto de congelação, limitando assim a formação de cristais de gelo intracelular (BARIL et al., 1995).

A maioria dos embriões mamíferos são criopreservados através do método de congelamento e equilíbrio tradicional, usando crioprotetores permeáveis, com baixas taxas de resfriamento e altas taxas de aquecimento. O congelamento tradicional segue os seguintes passos: 1) exposição dos embriões aos crioprotetores de baixo peso molecular, como etilenoglicol, glicerol, DMSO ou propilenoglicol até atingir o equilíbrio entre a solução e o embrião; 2) indução da cristalização a temperatura de  $-5^{\circ}$  a  $-7^{\circ}\text{C}$ ; 3) resfriamento lento controlado ( $0,2$  a  $2,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) até  $-30$  a  $-70^{\circ}\text{C}$ ; 4) Imersão dos embriões no nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ); 5) aquecimento controlado a uma velocidade de  $250^{\circ}\text{C}/\text{min}$  em banho maria; 6) remoção do crioprotetor a temperatura ambiente para posterior inovulação ou cultivo (PALASZ & MAPLETOFT, 1996).

Objetivando a sobrevivência à criopreservação, as células dos embriões devem permanecer ilesas e fisiologicamente funcionais durante todo o processo. Dessa forma, cada etapa do procedimento é considerada crítica e deve ser realizada cuidadosamente (PALASZ & MAPLETOFT, 1996).

Martinez & Matkovic (1998) obtiveram maior taxa de gestação utilizando etilenoglicol comparativamente ao glicerol, em protocolo tradicional de congelação de mórulas (59,4 vs 29,7%), mas não observaram diferenças para blastocistos ovinos (40,2 vs 51,3%). Igualmente, Sakul *et al.* (1993) obtiveram uma taxa de sobrevivência embrionária de 47,6% através da transferência de embriões congelados e descongelados.

Cocero *et al.* (1996) obtiveram 62,2% de taxa de gestação e 45,5% de sobrevivência embrionária em ovelhas inovuladas com embriões congelados com etilenoglicol, semelhantes ao resultado obtido com embriões inovulados a fresco (73,9 e 56,5%, respectivamente). Altas taxas de sobrevivência embrionária (73%) foram observadas através do processo de congelação utilizando um passo de diluição com etilenoglicol a 1,5M seguido de aquecimento com a remoção do crioprotetor em solução única de 1M de sacarose (McGINNIS *et al.*, 1993). Similarmente, Garcia-Garcia *et al.* (2006) demonstraram taxas de desenvolvimento embrionários *in vitro* semelhantes entre blastocistos obtidos a fresco (92,5%) e blastocistos congelados com etilenoglicol (83,7%).

Apesar dos resultados satisfatórios, a congelação tem como inconveniente à necessidade de um instrumental caro e um longo tempo para a realização do processo (BARIL *et al.*, 2001).

## 2.5 Vitrificação de Embriões Ovinos

O princípio da vitrificação consiste em submeter os embriões a altas concentrações de crioprotetores com a finalidade de aumentar a viscosidade dos meios intra e extracelulares. Sendo assim, torna-se possível resfriar os embriões, passando-os do estado líquido ao estado vítrio (gel amorfo) sem a formação de cristais de gelo intra e extracelular (KASAI, 1996). Este fenômeno pode ser considerado como um aumento extremo de viscosidade combinado a

uma rápida taxa de resfriamento, baseado na desidratação do embrião através de sua breve exposição a soluções com altas concentrações de crioprotetores, seguida de imersão direta em nitrogênio líquido (VAJTA, 2000).

As altas concentrações de crioprotetores podem causar danos às células devido a sua toxicidade química. Porém, os efeitos da toxicidade podem ser minimizados através da exposição breve aos crioprotetores e através de rápidas taxas de resfriamento (VAJTA *et al.*, 1998). Estas podem diminuir as injúrias celulares através da passagem direta pela zona perigosa de resfriamento entre +15°C e -5°C (MARTINO *et al.*, 1996). Além disso, os efeitos tóxicos podem ser controlados através da escolha do crioprotetor mais adequado, como etilenoglicol, glicerol ou DMSO, ou através da associação de dois ou mais crioprotetores (KASAI, 1996).

Embriões ovinos vêm sendo vitrificados com sucesso. Isachenko *et al.* (2003) obtiveram 70 % de prenhez em ovelhas inovuladas com embriões vitrificados em OPS, similar a embriões congelados pelo método tradicional. Porém, Papadopoulos *et al.* (2002) obtiveram taxas de gestação menores (50%) com embriões vitrificados quando comparados a embriões inovulados a fresco (90%). Mermillod *et al.* (1999) mostraram taxas de partição similares entre embriões ovinos vitrificados e a fresco transferidos pelo método indireto (50% e 60%, respectivamente). Em estudo realizado no Brasil em ovinos da raça Santa Inês não foi observada diferença significativa entre a viabilidade dos embriões congelados e vitrificados, porém os resultados foram considerados baixos, sendo a taxa de fertilidade aos 60 dias de 18,2% com embriões congelados e 6,7% com embriões vitrificados (CORDEIRO, 2001). No entanto, Martinez *et al.* (2006) na Argentina obtiveram resultados animadores e estatisticamente semelhantes quanto a taxa de gestação aos 30 dias de embriões vitrificados (41,1%) e congelados (46,4%).

Durante os últimos anos diversas técnicas de vitrificação vem sendo desenvolvidas com o objetivo de evitar as crioinjúrias, aumentando as taxas de resfriamento e aquecimento. Concomitante a isto, inúmeros agentes crioprotetores vêm sendo utilizados em diferentes concentrações e combinações, sendo estes adicionados a soluções em um único passo ou paulatinamente e mergulhados diretamente em nitrogênio líquido a partir da temperatura ambiente (DATTENA *et al.*, 2004). A utilização de volumes

pequenos de solução de vitrificação permite um resfriamento mais rápido e a redução de fraturas celulares (ARAV *et al.*, 2002).

Para atingirmos um maior sucesso no processo de vitrificação devemos observar três fatores principais: a viscosidade da solução, o volume e as taxas de resfriamento e aquecimento. A combinação de altas taxas de resfriamento com a redução do volume da solução a ser vitrificada pode diminuir os danos de membrana, melhorando a taxa de sobrevivência embrionária (YAVIN & ARAV, 2007).

A técnica de vitrificação mais conhecida é a convencional em palhetas de 0,25 mL (NAITANA *et al.*, 1997). Nessa, a taxa de resfriamento é de aproximadamente 2500°C/min (PALASZ & MAPLETOFT, 1996). Resultados animadores na vitrificação de embriões ovinos com a utilização desta técnica têm sido relatados por alguns autores. DATTENA *et al.* (2000) obtiveram 83,8% de re-expansão da blastocle após cultivo por 24 horas e 75% de taxa de nascimento de embriões vitrificados em palhetas de 0,25 mL, sendo resultados similares aos obtidos com embriões a fresco. Da mesma forma, Baril *et al.* (2001), relataram taxa de prenhez e de sobrevivência embrionária de 72 e 50% após inovulação de embriões vitrificados em palhetas de 0,25 mL.

Outra técnica que está se tornando mais usual é a técnica denominada *Open Pulled Straw* (OPS) que foi desenvolvida originalmente para embriões bovinos por Vajta *et al.* (1997). As palhetas de OPS foram desenvolvidas através das palhetas francesas de 0,25mL, sendo esticadas até que o diâmetro interno e a espessura da parede tivessem aproximadamente metade do tamanho original. Aproximadamente 1 a 2µL do meio de vitrificação contendo o embrião é introduzido na extremidade afilada da palheta através do efeito capilar simples. A extremidade contendo o embrião é imediatamente imersa no nitrogênio líquido, solidificando a coluna líquida sem que haja dispersão da solução (VAJTA *et al.*, 1998).

A taxa de resfriamento é aumentada em oito vezes quando comparada as palhetas francesas de 0,25mL, sendo acima de 20000°C/min (VAJTA *et al.*, 1998). Esta taxa de resfriamento é alcançada devido à redução do volume das soluções e a diminuição da espessura da parede da palheta (0,07mm). Dessa forma, os altos padrões de resfriamento e aquecimento resultam em

diminuição das crioinjúrias, como fraturas da zona pelúcida e danos ao embrião (VAJTA *et al.*, 1998).

Segundo López-Béjar & López-Gatius (2002), as taxas de sobrevivência embrionária, imediatamente após o reaquecimento dos embriões são melhores com a utilização de OPS comparada às palhetas convencionais. Entretanto, Datenna *et al.* (2004) não encontraram diferença significativa na taxa de gestação (70,0% vs 70,3%) e na taxa de partição de cordeiros após inovulação de embriões vitrificados em OPS (60,0% vs 62,9%) quando compararam embriões ovinos vitrificados em palhetas de 0,25 mL.

Apesar dos benefícios observados, na vitrificação em OPS ocorre o contato direto das células em meio crioprotetor com o nitrogênio líquido, o qual pode ter risco de contaminação por agentes bacterianos e virais (FOUNTAIN *et al.*, 1997). Estes perigos podem ser eliminados utilizando nitrogênio líquido esterilizado, além do armazenamento em containeres hermeticamente fechados (VAJTA *et al.*, 1998). No entanto, segundo Dattena *et al.* (2004) não foi observado nenhum problema de contaminação de embriões vitrificados através da técnica de OPS em nitrogênio líquido não esterilizado.

Na tentativa de aprimorar a técnica de vitrificação, foi desenvolvido um novo equipamento, o qual reduz a temperatura do nitrogênio líquido para -210°C através da utilização de pressão negativa (Vit-Master®; Minitüb, Tiefenbach, Germany). Esse procedimento aumenta em até quatro vezes as taxas de resfriamento (24000 – 130000°C/min) obtidas pelo método OPS (ARAV *et al.*, 2002).

A combinação da vitrificação com a transferência direta pode contribuir para simplificar os procedimentos num programa de transferência de embriões a campo (OKADA *et al.*, 2002). Baril *et al.* (2001) não observaram diferenças significativas entre o método de inovulação tradicional e a transferência direta dos embriões quanto a taxa de prenhez (74,0% versus 75,0%), taxa de partição (67,0% versus 75,0%) e na taxa de sobrevivência embrionária (49,0% versus 53,0%). Da mesma forma, Okada *et al.* (2002) obtiveram taxas de prenhez após a inovulação direta de 81% e de 74% no método indireto com diluição em placa, porém em ambos os casos, a taxa de partição foi de 58%.

## 2.6 Aquecimento dos embriões

O procedimento de retirada do crioprotetor é necessário para que ocorra a rehidratação dos embriões e diminua os danos causados pela sua toxicidade. A taxa de aquecimento pode influenciar a sobrevivência celular da mesma forma que a taxa de resfriamento (WOODS *et al.*, 2004). De acordo com Schneider & Mazur (1984), a diluição do crioprotetor tem como função evitar a entrada muito rápida de água na célula, pois uma redução drástica na osmolaridade levaria a lise celular. Este fenômeno pode ser assegurado pela adição de altas concentrações de compostos extracelulares, como a sacarose e trealose ao meio de diluição.

A sacarose atua como um tampão osmótico, mantendo constante a concentração do meio extracelular, regulando a velocidade de entrada e saída do crioprotetor no embrião, evitando o choque osmótico (LEIBO, 1984).

As palhetas francesas de 0,25mL são descongeladas através da imersão em banho Maria a 37°C. O conteúdo da palheta é depositado em soluções de descongelamento em um, dois ou três passos, com diferentes concentrações de sacarose. Martinez & Matkovic (1998) não observaram diferenças significativas quanto as taxas de prenhez e cordeiros desmamados na remoção de etilenoglicol de embriões congelados, realizando 1 passo ou 3 passos com utilização de sacarose.

Em embriões vitrificados, somente com o emprego da sacarose no preparo das palhetas foi possível a transferência direta. Esta técnica reduziu o tempo requerido para preparar os embriões a serem transferidos e eliminou a necessidade de equipamentos (BARIL *et al.*, 2001; DATENNA *et al.*, 2004). O aquecimento das palhetas de OPS é realizado pela colocação da ponta mais fina diretamente na placa contendo meio com sacarose a 37°C. O meio vitrificado volta ao estado líquido dentro de 1 a 2 segundos, sendo que imediatamente após, o embrião flutua no meio de diluição (VAJTA *et al.*, 1998). Os meios de aquecimento contém sacarose em diferentes concentrações, sendo a diluição realizada em um, dois ou três passos. Datenna *et al.* (2004) não observaram diferenças estatísticas no aquecimento de embriões vitrificados em uma ou três etapas quanto a taxa de gestação (75,0% e 70,0%,

respectivamente) e quanto a taxa de parição (57,1% e 60,0%, respectivamente).

## 2.7 Fatores que afetam a eficiência da criopreservação de embriões

O sucesso de um programa de transferência de embriões encontra-se na dependência de vários fatores como a qualidade embrionária, o número de embriões a serem transferidos, o local de deposição, o tempo transcorrido entre a colheita ou a descongelação e a transferência do embrião, a sincronização do estadió fisiológico entre a doadora/receptora e a resposta ovulatória da receptora (BARIL *et al.*, 1995). Os resultados da criopreservação estão relacionados previamente a dois fatores, a origem dos embriões e o estágio de desenvolvimento embrionário.

### 2.7.1 Origem dos embriões

Resultados ligeiramente menores aos obtidos com embriões a fresco são alcançados através da utilização de embriões criopreservados produzidos *in vivo* (PIV). Porém, resultados desanimadores são obtidos através da criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, devido provavelmente ao fato destes embriões serem mais sensíveis ao resfriamento e congelamento por possuírem maiores taxas de lipídeos (LEIBO & LOSKUTOFF, 1993). As condições *in vitro* ao qual os ovócitos e embriões se submetem podem afetar sua susceptibilidade ao congelamento, através do aumento de lipídeos intracelular ou ainda pela menor massa celular interna (MASSIP, 2001).

Datenna *et al.* (2004) mostraram diferenças marcantes de resultados entre embriões produzido *in vivo* e embriões PIV, porém acreditam que a melhora nas taxas de sobrevivência dos embriões PIV estão relacionados muito mais as condições de cultivo e à qualidade dos embriões do que mudanças na tecnologia de criopreservação.

### 2.7.2 Estádio de desenvolvimento embrionário

O estágio de desenvolvimento embrionário é considerado um fator crítico para a viabilidade do embrião após a criopreservação (LEIBO *et al.*,

1996). Diversos estudos sobre o efeito do estágio de desenvolvimento embrionário na taxa de sobrevivência dos embriões foi conduzido comparando-se mórula e blastocisto devido a complexidade da colheita de embriões em estágios iniciais *in vivo* (MASSIP, 2001).

Recentemente, Garcia-Garcia *et al.* (2006) demonstraram a habilidade dos embriões em sobreviverem aos processos de congelação e descongelação em diversos estágios de desenvolvimento. Estes autores obtiveram uma taxa de sobrevivência embrionária variando de 17,1% a 31,4% em embriões congelados em estágios iniciais de desenvolvimento (2 a 12 células), em contrapartida, obtiveram uma maior sobrevivência dos embriões em estágio de mórula inicial, mórula e blastocisto (40,5%, 46,3% e 83,7%, respectivamente). Este estudo indica que embriões em estágios iniciais são mais sensíveis ao processo de congelação e que a taxa de sobrevivência embrionária a criopreservação aumenta com o crescimento progressivo do embrião, com uma diferença substancial entre mórula e blastocisto. Este trabalho corrobora com os trabalhos prévios mostrando que em ovinos o estágio de blastocisto é o mais resistente ao processo de congelação. Este aumento da criotolerância em estágios mais avançados parece estar relacionado a um maior número de células e a um menor tamanho celular, o qual melhora a tolerância ao resfriamento quando comparado aos estágios iniciais embrionários com poucas e grandes células, onde as junções entre os blastômeros são fracas. Além disso, a permeabilidade ao crioprotetor talvez seja menor em embriões em estágios mais recentes (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2006). Igualmente, Cocero *et al.* (1996) demonstraram um melhor desenvolvimento embrionário *in vitro* no estágio de blastocisto (70,5%) comparado ao estágio de mórula (57,9%) em embriões congelados.

Não obstante, a vitrificação pode ser usada como uma alternativa para aumentar a criotolerância destes embriões no estágio inicial de desenvolvimento (VAJTA, 2000). Porém, Baril *et al.* (2001) não observaram diferenças significativas na taxa de desenvolvimento embrionário em embriões vitrificados no estágio de mórula (50,0%) e blastocisto (55,0%). Contudo, estes autores observaram diferenças na taxa de sobrevivência embrionária em receptoras nulíparas quando inovuladas com embriões em estágios iniciais (33,0%) e com estágios mais avançados (52,0%). Similarmente, Vajta *et al.*

(1996) demonstraram que a viabilidade de embriões ovinos e bovinos vitrificados no estágio de blastocisto expandido é maior do que no estágio de mórula devido a sua maior tolerância ao resfriamento depois da formação do blastocele.

### **3. Objetivos**

Devido à necessidade de aprimorar as técnicas de biotecnologia atualmente empregadas na reprodução de ovinos e com o intuito de melhorar a relação custo-benefício da aplicação das mesmas, o presente estudo teve por objetivo:

a) avaliar a viabilidade embrionária através da taxa de prenhez de embriões ovinos criopreservados pelos métodos de congelação ou vitrificação em OPS.

b) comparar a viabilidade embrionária quanto a taxa de prenhez entre duas técnicas de inovulação de embriões congelados ou vitrificados: inovulação direta ou indireta;

c) comparar a viabilidade embrionária quanto a taxa de prenhez entre diferentes estadios de desenvolvimento de embriões congelados ou vitrificados.

#### **4. Material e métodos**

O experimento foi realizado na central de biotecnologias ovina “Aries Reprodução e Melhoramento Genético Ovino Ltda” situada na “Fazenda Campo Verde”, região Oeste do Estado de São Paulo, latitude de 22°S, no período de Novembro de 2006 a Maio de 2007.

##### *4.1 Produção de embriões*

Quarenta e uma ovelhas adultas, com idade de 2 a 6 anos, da raça Ile de France, com excelente performance reprodutiva, foram utilizadas como doadoras. Os ciclos estrais das doadoras foram controlados com a inserção de dispositivos intravaginais impregnados com 0,33 g de progesterona (Eazi-breed CIDR<sup>®</sup>- Pfizer) no Dia 0, sendo substituído por um novo dispositivo no Dia 7, este mantido até o Dia 14. As ovelhas receberam uma dose única de 125 µg i.m. de cloprostenol (Ciosin<sup>®</sup>-Coopers), no início do tratamento com FSH no Dia 12. A superestimulação foi realizada com o hormônio folículo estimulante – pFSH (Folltropin-V<sup>®</sup>-Bioniche) na dose total de 200mg (10,0mL), divididas em oito aplicações decrescentes ( 40 e 40; 30 e 30; 20 e 20; 10 e 10 mg, respectivamente) com intervalos de 12 horas. Juntamente à retirada dos dispositivos intravaginais no décimo quarto dia, foi aplicado 200 UI de gonadotrofina coriônica eqüina - eCG (Novormon<sup>®</sup>-Symtex). As inseminações intrauterinas foram realizadas por meio de laparoscopia (IALP) com sêmen fresco obtidos de carneiros comprovadamente férteis na dose de  $1,0 \times 10^9$ /mL, trinta e seis e quarenta e três horas após a remoção dos dispositivos intravaginais e aplicação do eCG no dia 14. Os embriões foram coletados 6 dias após a inseminação artificial.

##### *4.2 Colheita de Embriões*

As colheitas foram realizadas no 6º dia após a inseminação artificial, visando obter embriões em estadios de mórula até blastocisto expandido. Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 24 horas e hídrico de 12 horas antes da colheita e anestesiados mediante o emprego de 0,2 mg/Kg de cloridrato de xilasina (Rompun<sup>®</sup>-Bayer) associado a 7,5mg/Kg de cloridrato de quetamina (Francotar<sup>®</sup>-Virbac) por via intramuscular. Os animais anestesiados

foram mantidos em decúbito dorsal com os membros estendidos, em mesa cirúrgica de pequenos ruminantes e em seguida foram procedidas a tricotomia, lavagem e assepsia da região abdominal.

As colheitas foram realizadas por laparotomia, na qual os cornos uterinos foram expostos por leve tração através de uma incisão de 7cm sobre a linha média cranialmente ao úbere. Foi introduzida em cada corno uterino próximo à bifurcação uma sonda *Foley* número 10 (Solidor<sup>®</sup>) e na extremidade da tuba uterina, foi realizada a colocação de uma sonda fabricada a partir de uma agulha 40x12, na qual foi injetada a solução de lavagem. Cada corno foi lavado uma única vez, individualmente com 50 mL de PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) pré-aquecido e suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB), sendo o líquido coletado em tubos graduados Falcon de 50 ml.

Após a colheita, o útero foi irrigado com solução fisiológica heparinizada à temperatura de 37°C, com o objetivo de evitar aderência. O peritônio e o tecido muscular foram suturados com fio *cat gut* cromado número 2 em pontos tipo cerzadura e a pele com fio de nylon numero 0 em pontos separados simples. Ao término do procedimento, cada ovelha também recebeu 1.500.000UI de Penicilina Benzatina (Pentabiótico Veterinário Reforçado<sup>®</sup> –Fort Dodge) e 125 µg i.m. de cloprostenol (Ciosin<sup>®</sup>-Coopers).

#### 4.3 Classificação dos Embriões

Inicialmente o líquido colhido em tubos graduados tipo Falcon de 50 mL foi transferido para Placas de Petri de 100 mm de diâmetro com fundo quadriculado para procura dos embriões sob estereomicroscópio binocular (Aumento de 150x). As estruturas encontradas foram então, transferidas com o auxílio de pipeta automática para Placas de Petri com 60 mm de diâmetro contendo meio de manutenção (TQC Holding Plus<sup>®</sup>–Nutricell). Os embriões foram avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento e classificados qualitativamente (STRINGFELLOW & SEIDEL, 1998), sendo selecionados os embriões no estágio de mórula a blastocisto expandido com qualidade excelente (Grau 1) e boa (Grau 2). Posteriormente, os embriões foram lavados em dez passagens de soluções, sendo 4 banhos com PBS + 0,4% BSA, 1 banho de tripsina (Nutricell) em PBS (1:250) e 5 banhos de PBS + 2% SFB,

segundo os procedimentos recomendados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), e em seguida foram destinados a inóculo a fresco ou a criopreservação.

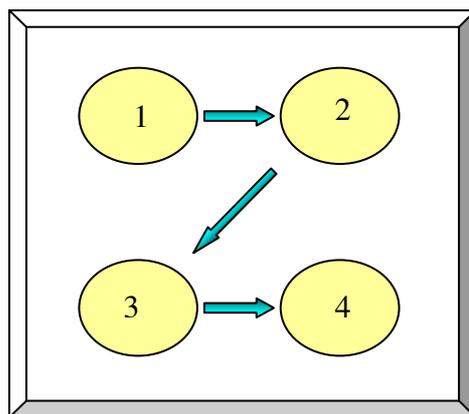
#### *4.4 Criopreservação dos Embriões*

##### *4.4.1 Congelação tradicional*

Os embriões foram congelados utilizando congelador automático de embriões (TK 2000 – Nutricell) segundo metodologia descrita por Martinez & Matkovic (1998), modificado. Antes da congelação os embriões passaram por três soluções com concentrações crescentes de crioprotetor (etilenoglicol – EG a 0,5; 1,0 e 1,5M), contendo PBS e SFB a 20%, permanecendo em cada uma destas soluções por 5 minutos. Os embriões foram envasados em palhetas adequadamente identificadas de 0,25mL tomando-se o cuidado de colocar o embrião em uma coluna de 25 $\mu$ L no meio da palheta. A coluna contendo o embrião e a solução crioprotetora foi separada de duas colunas com solução de manutenção, por duas bolhas de ar de 1,0 cm. As palhetas foram seladas e colocadas no congelador inicialmente programado a uma velocidade de resfriamento de -3,0°C/min até -6°C, a partir da temperatura ambiente (20°C). Alcançada a temperatura de -6°C, o processo de resfriamento foi interrompido por cinco minutos, para a indução da cristalização (*seeding*) esperando-se 10 minutos para reiniciar a curva, de modo que, o congelador de embriões seja re-programado para uma velocidade de congelação de -0,5°C/minuto até -32°C. Após 5 minutos de estabilização à temperatura final de congelação, as palhetas contendo os embriões foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido a -196°C e acondicionadas em botijões criobiológicos (Figura 1).

a)

Placa de 4 poços



- Poço 1: Solução PBS + 20%SFB (5 min)
- Poço 2: 0,5M EG (5 min)
- Poço 3: 1,0M EG (5 min)
- Poço 4: 1,5M EG (5 min)

b)

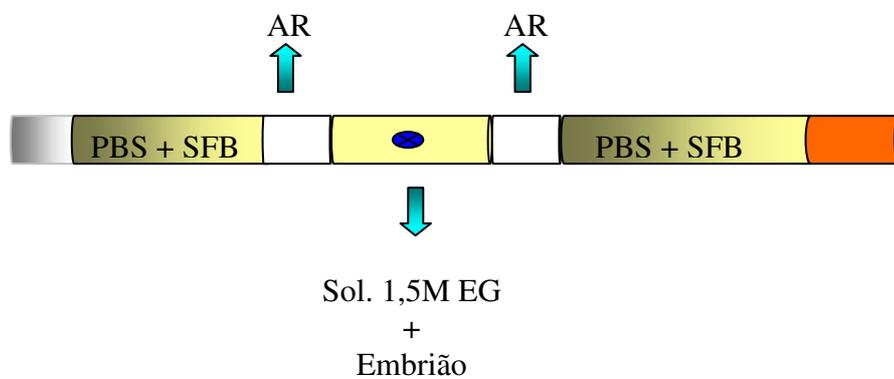
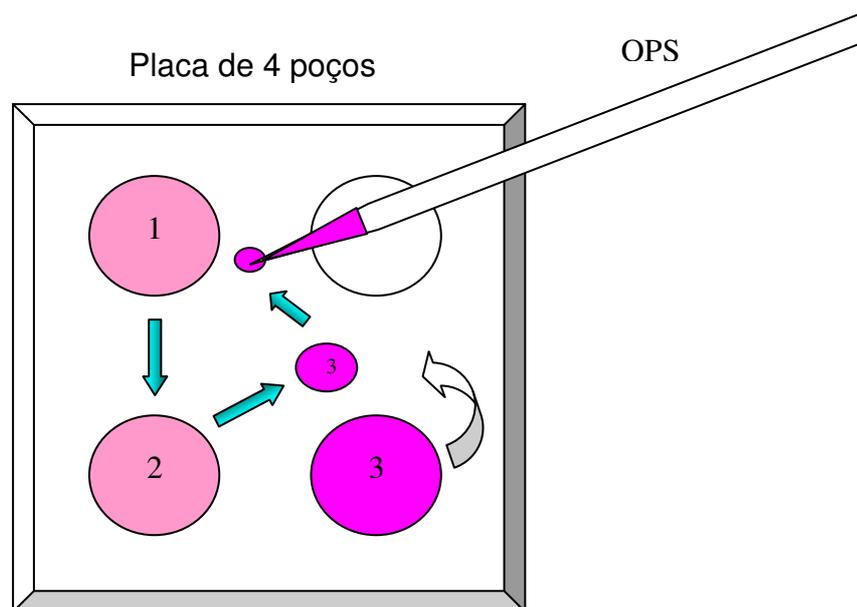


FIGURA 1 – a) Esquema simplificado das passagens dos embriões pelos meios de congelamento.

b) Esquema simplificado da preparação da palheta para a técnica de congelamento de embriões.

#### 4.4.2 Vitriificação em OPS (*Open Pulled Straw*)

Os embriões destinados à vitriificação foram submetidos ao protocolo descrito por DATTENA et al. (2004), modificado. Todas as soluções para a vitriificação foram preparadas usando a solução base com H-TCM 199 suplementado com 20% de SFB (Solução *holding*) a 20 °C. Os embriões foram expostos primeiramente à solução *holding* por 5 minutos e em seguida expostos as soluções de vitriificação. Imediatamente após a passagem pela solução *holding*, os embriões foram transferidos a solução de 10% de EG e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) por 1 minuto e 45 segundos e em seguida expostos a 20µL de solução de 20% de EG, 20% de DMSO e 0,5M sacarose por 30 segundos no máximo (Figura 2). Em seguida, os embriões foram aspirados em 1µL da última solução envasados por capilaridade em OPS devidamente identificadas com número da fêmea e tipo de embrião. Imediatamente as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido a -196°C e acondicionadas em racks individuais para cada fêmea e armazenadas em botijões criobiológicos.



- Poço 1: Solução *holding* (5 min)
- Poço 2: 10% EG + 10% DMSO (1 min e 45 seg)
- Poço 3: 20% EG + 20% DMSO + 0,5M sacarose(30 seg)
- Gota 20 $\mu$ L: solução 3
- Gota 1 $\mu$ L: solução 3 + embrião

FIGURA 2 – Representação esquemática da técnica de vitrificação de embriões em OPS.

#### 4.5 Aquecimento dos embriões

##### 4.5.1 Descongelção de embriões congelados e rehidratação em placa (técnica indireta)

Os embriões foram descongelados expondo-se as palhetas à temperatura ambiente por 10 segundos e sua posterior imersão em banho-maria a 37°C por 20 segundos. O conteúdo das palhetas foi esvaziado em Placa de quatro poços (Nunc<sup>®</sup>), sendo o crioprotetor removido em 2 passos (*two step*) colocando-se os embriões em solução de 0,5M de sacarose em

PBS suplementado com 20% de SFB e em solução de manutenção (PBS + 20% SFB) por 5 minutos cada passo. Depois de reidratados, os embriões foram aspirados em unopette (20 $\mu$ L- Minitube<sup>®</sup>-19025/0020) acoplado a seringa de 1ml para serem imediatamente transferidos às receptoras conforme descrição no item 4.6.

#### *4.5.2 Descongelamento de embriões congelados e transferência direta (técnica direta)*

As palhetas foram aquecidas primeiramente por 10 segundos no ar e depois mergulhados em banho Maria a 37°C por 20 segundos e agitadas para que ocorra a mistura das colunas das palhetas. Os embriões foram transferidos diretamente das palhetas para as receptoras conforme descrição no item 4.6.

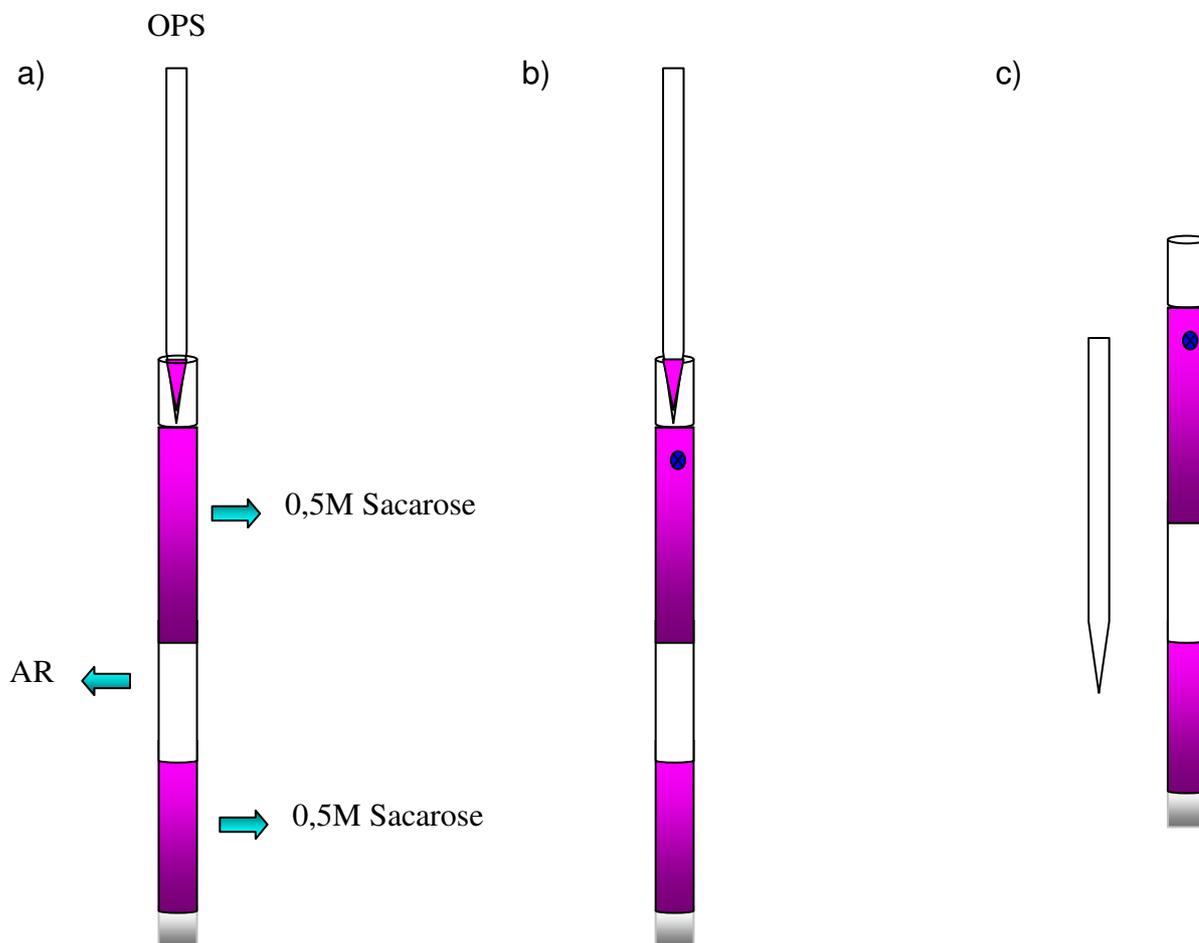
#### *4.5.3 Aquecimento dos embriões vitrificados e rehidratação em placa (técnica indireta)*

Para a descongelamento dos embriões vitrificados, as palhetas foram aquecidas por 3 segundos no ar e posteriormente, a extremidade final da OPS foi colocada diretamente na solução 0,25M de sacarose em H-TCM 199 suplementado com 20% de SFB. Após 5 minutos, os embriões foram transferidos para solução de 0,125M de sacarose e em solução de manutenção (H-TCM 199 + 20% SFB), por 5 minutos cada etapa. Os embriões foram aspirados em unopette (20 $\mu$ L- Minitube<sup>®</sup>-19025/0020) acoplado a seringa de 1ml para serem imediatamente transferidos às receptoras conforme descrição no item 4.6.

#### *4.5.4 Aquecimento dos embriões vitrificados e transferência direta (técnica direta)*

As palhetas foram aquecidas por 3 segundos no ar e imediatamente introduzidas com a extremidade mais fina dentro da palheta de 0,25mL na posição vertical, preparada com uma solução 0,5M de sacarose. O preparo da palheta de 0,25mL foi realizado colocando-se uma coluna de 2cm de solução 0,5M de sacarose, 2cm de coluna de ar e completada com solução 0,5M sacarose, de modo que na extremidade distal da palheta teremos uma coluna

de 0,5 cm vazia. A extremidade fina da OPS era introduzida na palheta de 0,25mL já preparada por aproximadamente 3 segundos e retirada vagorosamente. Após 30 ou 40 segundos mantendo a palheta na vertical o embrião era transferido a fêmea receptora conforme descrição no item 4.6.



Palheta 0,25 mL

FIGURA 3 – Representação esquemática da técnica de aquecimento de embriões vitrificados em OPS para inovulação direta.

- Introdução da OPS na palheta de 0,25 mL imediatamente após sua retirada do nitrogênio líquido.
- Retirada vagorosa da OPS após eliminação do embrião (3 seg).
- Palheta de 0,25 mL preparada para inovulação nas receptoras (30 a 40 seg).

#### 4.6 Inovação dos Embriões e diagnóstico de gestação

Cento e trinta e sete receptoras adultas sem raça definida (SRD) clinicamente híginas, foram submetidas ao protocolo de indução do estro e da ovulação mediante ao uso de esponjas intravaginais com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon<sup>®</sup>-Syntex) por um período de 14 dias. No décimo quarto dia foi aplicado 500 UI de eCG concomitante a retirada das esponjas. Vinte e quatro horas após a remoção das esponjas, foram introduzidos machos rufiões para promover a detecção do estro.

Nas fêmeas em que o estro característico foi detectado, as inovações foram realizadas por laparoscopia no dia 8 após a retirada do dispositivo intravaginal. As receptoras foram previamente submetidas a jejum hídrico-alimentar de no mínimo 12 horas, realizadas a tricotomia e assepsia do abdômen, seguidas de sedação com 0,05mg/Kg de acepromazina (Acepran<sup>®</sup>-Univet). Inicialmente foi avaliada a resposta ovariana quanto a presença de um ou mais corpos lúteos funcionais face ao protocolo de indução do estro. Posteriormente com uma pinça de manipulação, foi realizada a tração do corno uterino *ipsis* lateral ao ovário com corpo lúteo, expondo-o através da incisão feita para a passagem do instrumental. Para inovação, a parede do corno uterino foi perfurada com agulha 40x12, sempre se certificando que a luz uterina fora atingida. Posteriormente era inserida a palheta de 0,25mL ou o unopette (20µL- Minitube<sup>®</sup>-19025/0020) acoplado a seringa de 1mL contendo os embriões. Foi inovulado somente um embrião por receptora.

O diagnóstico de prenhez foi realizado 30 dias após a inovação com equipamento de ultra-sonografia Aloka<sup>®</sup> – Modelo SSD 500, e transdutor linear de 5Mhz, por via retal.

#### 4.7 Delineamento experimental

Um total de 137 embriões ovinos produzidos *in vivo* com qualidade excelente e boa foram utilizados neste experimento. Mórulas e blastocistos foram divididos em três grupos. No primeiro grupo, controle, os embriões não foram criopreservados sendo transferidos frescos; no segundo grupo os

embriões foram criopreservados através do método de congelação e no terceiro grupo pelo método de vitrificação em OPS. Os embriões criopreservados foram ainda subdivididos em duas técnicas de transferência, direta, onde não há avaliação morfológica dos embriões, e a indireta, sendo os embriões avaliados em estereomicroscópio quanto sua qualidade e viabilidade (Tabela 1).

TABELA 1 – Distribuição dos embriões inovulados segundo os tratamentos.

<b>Embriões</b>	<b>Técnica de Transferência</b>	<b>Número de Embriões</b>
<b>Fresco</b>	-	50
<b>Congelado</b>	Indireta	21
	Direta	23
<b>Vitrificado</b>	Indireta	22
	Direta	21

Os tratamentos foram avaliados quanto aos parâmetros quanti-qualitativos a seguir:

- Distribuição qualitativa dos embriões segundo seu estadio de desenvolvimento (mórula e blastocisto) e viabilidade embrionária pós-criopreservação (STRINGFELLOW & SEIDEL, 1998);
- Taxa de prenhez aos 30 dias: número de ovelhas prenhez pelo número de ovelhas inovuladas.

#### 4.8 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foram utilizados os testes não paramétricos de Wilcoxon para a técnica de inovulação e estadios embrionários e Kruskal Wallis para o método de criopreservação. Os dados foram processados utilizando-se o programa estatístico SAEG (2000).

## 5. Resultados

De um total de 243 embriões colhidos de 41 doadoras, 147 embriões foram selecionados, de excelente e boa qualidade, e distribuídos equitativamente nos três tratamentos, para evitar uma variação entre dias de colheita e doadoras. A viabilidade embrionária foi avaliada pela determinação da taxa de gestação e análise embrionária pós-descongelamento. Todos os embriões vitrificados ou congelados que foram avaliados pós-aquecimento estavam com qualidade adequada a inovação. Somente três embriões, sendo um vitrificado e dois congelados tiveram a zona pelúcida rompida durante o processo de criopreservação, porém foram inovulados e uma receptora foi diagnosticada prenhe.

A taxa de gestação com embriões a fresco foi de 50%, semelhante aquela obtida em receptoras inovuladas com embriões congelados (38,6%) ou vitrificados (55,8%) (Tabela 2). Da mesma forma, não foi encontrada diferença significativa entre as taxas de gestação em receptoras inovuladas pelos métodos direto e indireto, tanto para embriões congelados como para vitrificados (Tabela 3). No entanto, embriões vitrificados inovulados diretamente resultaram em maior taxa de gestação que os embriões congelados e inovulados pela mesma técnica ( $P=0,07$ ).

TABELA 2 – Taxas de gestação (%) após inovação de embriões ovinos congelados, vitrificados ou a fresco.

Embriões	Receptoras (n)	Embriões transferidos (n)	Taxa de gestação (%)
Frescos	50	50	50,0
Congelados	44	44	38,6
Vitrificados	43	43	55,8

Não há diferença estatística entre os grupos ( $P= 0,15$ ).

TABELA 3 – Taxas de gestação (%) após inovação direta e indireta de embriões ovinos produzidos *in vivo* congelados ou vitrificados.

Embriões	Inovação	Embriões transferidos (n)	Taxa de gestação (%)
Congelados	Direta	23	34,8 <sup>b</sup>
	Indireta	21	42,9
Vitrificados	Direta	21	57,1 <sup>a</sup>
	Indireta	22	54,5

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si (a vs. b:  $P= 0,07$ ).

Para se verificar o efeito do estadio de desenvolvimento embrionário na taxa de gestação, os embriões jovens foram considerados de mórula a mórula compacta e os embriões em estadio mais avançados de blastocisto inicial a blastocisto expandido para os grupos de embriões congelados e vitrificados. Embriões vitrificados mostraram maior viabilidade em estadio de mórula em relação aos embriões congelados no mesmo estadio ( $P=0,07$ ). Em contrapartida, resultados similares foram obtidos entre blastocistos criopreservados para ambos os métodos (Tabela 4).

TABELA 4 – Taxa de gestação (%) após inovulação de embriões ovinos congelados e vitrificados de acordo com o estadio de desenvolvimento embrionário.

<b>Metódo de Criopreservação</b>	<b>Estadio Embrionário</b>	<b>Embriões Transferidos</b>	<b>Taxa de Gestação (%)</b>
Congelação tradicional	Mórula	18	38,9 <sup>b</sup>
	Blastocisto	25	36,0
Vitrificação	Mórula	25	64,0 <sup>a</sup>
	Blastocisto	18	44,4

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si (a vs. b,  $P=0,07$ ).

## 6. Discussão

As biotecnologias de reprodução assistida como inseminação artificial e transferência de embriões tem sido aplicadas para aprimorar a eficiência reprodutiva e acelerar o ganho genético (COGNIÉ et al., 2003). Segundo THIBIER & NIBART (1992) a condição das receptoras à transferência de embriões, principalmente, no tocante à nutrição e saúde, é responsável por 50,0% da taxa de prenhez, sendo os outros 50,0% diretamente dependentes da qualidade embrionária. A qualidade do embrião para transferência tem um significativo efeito na taxa de sobrevivência embrionária. Neste estudo, a taxa de gestação de embriões a fresco de excelente e boa qualidade foi de 50%, enquanto, Bari et al. (2003) obtiveram excelentes taxas de sobrevivência embrionária quando inovulados embriões a fresco grau 1 (75,6%) e 2 (73,8%). A literatura indica uma taxa de prenhez de embriões produzido *in vivo* e inovulados a fresco, variando de 70 a 90% (DATTENA et al., 2000; PAPADOPOULOS et al., 2002; MARTÍNEZ et al., 2006). Enfim, sugere-se neste estudo que esta diferença na taxa de sobrevivência embrionária seja possivelmente em decorrência de fatores intrínsecos das receptoras utilizadas.

Com o incremento da atividade de ovinocultura e conseqüente multiplicação de animais geneticamente superiores, a criopreservação de embriões vem sendo utilizada rotineiramente por muitos profissionais. Comercialmente, a técnica mais utilizada para a criopreservação de embriões ovinos é a congelação tradicional. A congelação tradicional é um processo físico no qual as células embrionárias são desidratadas progressivamente através de soluções crioprotetoras, provocando um decréscimo no ponto de congelação, limitando assim a formação de cristais de gelo intracelular (BARIL et al., 1995). O tipo e a concentração de crioprotetores são fatores importantes para a sobrevivência de embriões congelados. Diversos estudos tem demonstrado que o etilenoglicol é o crioprotetor mais efetivo para o processo de congelação de embriões ovinos (SONGSASEN et al., 1995; COCERO et al., 1996). Segundo, MARTINEZ & MATKOVIC (1998) melhores resultados quanto à taxa de prenhez foram obtidos utilizando-se etilenoglicol quando comparado ao glicerol em protocolo tradicional de congelação de mórulas (59,4 vs 29,7%). Da mesma forma, McGinnis et al. (1993) mostraram alta taxa de sobrevivência *in vitro* e *in vivo* (73%) de embriões ovinos congelados com

1,5M de etilenoglicol em um passo de diluição, seguido de um passo de remoção de crioprotetor em 1M de sacarose.

No presente experimento foram utilizados três passos de diluição (0,5, 1,0 e 1,5 M EG) para a congelação tradicional e um passo (0,5M sacarose) para retirada de crioprotetor nos embriões inovulados indiretamente. Os embriões inovulados pela técnica direta não passou por meio com sacarose. Os resultados obtidos quanto a taxa de prenhez (38,6%) foram consistentes com outros trabalhos, existindo uma variação na literatura quanto a taxa de prenhez variando de 35 a 70% em embriões congelados (FAHNING & GARCÍA, 1992; ISACHENKO et al., 2003). Corroborando, Sakul et al. (1993) obtiveram uma taxa de sobrevivência embrionária de 47,6% através da transferência de embriões congelados. No entanto, comparando-se embriões congelados e inovulados a fresco neste experimento, não foi observada diferença significativa. Da mesma forma, Cocero et al. (1996) não demonstraram diferenças nas taxas de prenhez entre embriões congelados com EG e inovulados a fresco (62,2% e 73,9%).

A inovulação direta de embriões congelados parece ser tão efetiva quanto a transferência indireta após a remoção e avaliação *in vitro*. A principal vantagem da inovulação direta está no fato de reduzir o custo da transferência, evitando a eliminação equivocada de embriões, além de simplificar a transferência de embriões a campo. Poucos trabalhos foram publicados em relação a transferência direta de embriões congelados em pequenos ruminantes. Neste estudo foram observadas taxas similares de prenhez em embriões ovinos congelados, inovulados direta e indiretamente (38,8% e 42,9%, respectivamente). Similarmente, Guignot et al. (2006) utilizando embriões caprinos, obtiveram 59% de prenhez em embriões congelados e inovulados diretamente.

Embora os resultados da criopreservação de embriões ovinos pelo método de congelação tradicional sejam satisfatórios e consistentes, este processo tem como inconveniente à necessidade de um instrumental caro e um longo tempo para sua realização (BARIL et al., 2001). O uso de técnicas de criopreservação ultra rápidas como a vitrificação pode ajudar a reduzir os custos, pois esta não necessita de equipamentos especiais podendo ser adaptada facilmente a

rotina de campo. Ao mesmo tempo, a vitrificação poderia ser utilizada como alternativa para aumentar a criotolerância de embriões cujo resultado com a congelação tradicional não é satisfatória, como embriões em estadio recente de desenvolvimento e embriões produzido *in vitro*.

A vitrificação de embriões vem sendo estudada há mais de 10 anos, entretanto até hoje, não tem sido amplamente aceita pelos veterinários atuantes em produção de embriões. Diversas razões parecem estar vinculadas a este fato, tais como: resultados aceitáveis quanto a taxa de prenhez em embriões congelados; extrema variedade de técnicas de vitrificação e a falha em padronizar esta biotecnologia; os resultados disponíveis em sua maioria são embriões produzidos *in vitro*, não encorajando a realização a campo de embriões produzidos *in vivo*; a vitrificação parece ser mais simples, porém na realidade, necessita-se de muita habilidade do técnico; por fim, há um mínimo interesse das empresas que produzem equipamentos de congelação em divulgar a vitrificação pois esta pode ser realizada utilizando uma simples caixa de isopor (VAJTA, 2000).

A estratégia de vitrificação tem sua principal diferença à congelação pela taxa de resfriamento. Uma baixa taxa de resfriamento permite manter um balanço tênue entre vários fatores, que pode resultar em danos celulares através da formação de cristais de gelo, efeito tóxico dos crioprotetores, eletrólitos intracelulares, fratura de zona pelúcida, crioinjúrias, e alterações intracelulares de organelas, citoesqueleto e contatos juncionais (MASSIP et al., 1995; DOBRINSKY, 1996). Uma consequência negativa da vitrificação é que esta aumenta a probabilidade destas formas de injúrias celulares exceto pelas injúrias causadas por formação de cristais de gelo. Diferentes estratégias são usadas para minimizar os danos tóxicos e osmóticos, utilizando crioprotetores com menor toxicidade, combinação de dois ou três crioprotetores (incluindo ao menos um crioprotetor não permeável) e exposição dos embriões a múltiplos passos de aquecimento em soluções decrescentes de crioprotetores (KASAI, 1996).

A maioria das publicações comparando a congelação tradicional e a vitrificação em embriões ovinos reportaram taxas de sobrevivência *in vivo* ou *in vitro* similares ou melhores após a vitrificação (MARTÍNEZ et al., 2006;

ISACHENKO et al., 2003; VAJTA, 2000). Os resultados deste trabalho mostraram taxas de prenhez similares entre embriões vitrificados em OPS e congelados (55,8% e 38,6%, respectivamente). Da mesma forma, Isachenko et al. (2003), demonstrando taxas de prenhez aos 55 dias semelhantes entre a congelação (47%) e a vitrificação em palheta OPS (60%). Em trabalho mais recente com embriões caprinos, Guignot et al. (2006) obtiveram semelhantes taxas de prenhez aos 43 dias entre embriões congelados (73%) e embriões vitrificados em palheta de 0,25 mL (52%).

Da mesma forma, neste experimento, os resultados não foram estatisticamente diferentes entre embriões inovulados a fresco e vitrificados. Similarmente, Datenna et al. (2000) reportaram taxas de prenhez e partição estatisticamente iguais entre embriões vitrificados e inovulados a fresco (70,3% e 75% x 93,7 e 81,2%, respectivamente). Porém taxas menores de prenhez foram observadas em nosso estudo, sendo 55,8% para embriões vitrificados e 50,0% para embriões inovulados a fresco. Papadopoulos et al. (2002) na Irlanda, utilizando blastocistos vitrificados em palheta OPS obtiveram 50% de prenhez em relação a 90% de prenhez com inovulação de embriões a fresco, não sendo estatisticamente diferentes. Datenna et al. (2000) e Baril et al. (2001) também obtiveram resultados semelhantes de taxa de prenhez, acima de 70%, em ovelhas inovuladas com embriões a fresco e vitrificados.

No entanto, a principal vantagem da técnica de vitrificação em OPS e inovulação direta está no fato dos embriões serem rapidamente resfriados (20.000°C/min) devido a porção mais fina da OPS e o aquecimento também ser rápido e de fácil execução, introduzindo a OPS em meio aquecido dentro de uma palheta francesa de 0,25 mL, podendo o embrião ser transferido diretamente a receptoras sincrônicas, sem a necessidade de equipamentos. Os resultados deste experimento demonstraram que a utilização de transferência direta de embriões vitrificados em OPS é vantajosa e encorajadora na aplicação desta biotécnica a campo, observando melhores taxas de prenhez em embriões vitrificados inovulados pela técnica direta em relação aos embriões congelados e inovulados diretamente ( $p=0,07$ ). No entanto, os resultados não foram diferentes quanto as taxas de prenhez entre os embriões congelados e vitrificados utilizando a técnica indireta de inovulação após a avaliação da qualidade embrionária. Apesar neste

experimento nenhum embrião avaliado pós-descongelamento tenha sido considerado inviável a inóvulação, Cognié et al., (2003), constataram que a avaliação morfológica após a criopreservação e aquecimento não possui acurácia elevada e pode ser uma fonte de conflito durante a comercialização de embriões. Sendo assim, segundo estes autores, o uso da técnica direta de inóvulação elimina a necessidade de avaliação dos embriões e representa um ganho potencial de 7 a 8% em termos de animais nascidos.

Similarmente, Vajta et al. (1999) utilizando a mesma técnica em embriões bovinos demonstraram uma alta eficiência *in vitro* da vitrificação e aquecimento da OPS em palheta de 0,25mL com solução de sacarose. No entanto, Isachenko et al. (2003) utilizando uma técnica de inóvulação direta de embriões vitrificados em OPS um pouco diferente da utilizada pelo nosso grupo, obtiveram resultados excelentes quanto a taxa de prenhez (60 a 73%) e taxa de parição (58 a 73%). Da mesma forma, com palhetas francesas de 0,25 mL, Baril et al. (2001) obtiveram resultados promissores quanto a inóvulação direta de embriões vitrificados (75% de taxa de prenhez).

O estadio de desenvolvimento embrionário é considerado um fator crítico para a viabilidade dos embriões após criopreservação e aquecimento. Esta diminuição de viabilidade pode ser causada pela alta sensibilidade dos estadios iniciais de desenvolvimento, principalmente a congelamento. Sendo assim, a vitrificação pode ser uma das alternativas para aumentar a criotolerância dos estadios embrionários mais recentes.

No presente experimento não foi observada diferença estatística entre os estadios embrionários de embriões congelados quanto a taxa de prenhez, sendo 38,9% para embriões jovens (mórula) e 36,0% para embriões em estádios mais avançados (blastocisto). Da mesma forma, Cocero et al. (1996) não obtiveram diferenças significativas entre mórulas e blastocistos congelados com EG quanto a taxa de prenhez (60,8% e 63,6%, respectivamente). Em contrapartida, mais recentemente, Garcia-Garcia et al. (2006) comparando a sensibilidade de diferentes estadios de desenvolvimento embrionário a congelamento, constataram que há um aumento progressivo na sobrevivência embrionária à medida que o desenvolvimento do embrião avança de mórula a blastocisto, principalmente. Estes autores explicam que esta melhora na taxa de sobrevivência a congelamento de embriões em estadios

mais avançados possivelmente está relacionada com maior tamanho e menor número de células e maior contato juncional entre as células do embrião, sugerindo que a vitrificação possa ser usada como alternativa para aumentar a criotolerância de embriões em estádios recentes de desenvolvimento. Contudo, Baril et al. (2001) não demonstraram diferenças significativas na taxa de sobrevivência embrionária quando inovularam embriões vitrificados em estágios recentes e avançados de desenvolvimento (76% x 94%). Entretanto, no presente experimento observou-se um aumento na taxa de prenhez quando foram inovulados embriões vitrificados em estadio mais jovem (64,0%).

Apesar dos resultados animadores quanto a vitrificação de embriões ovinos em OPS obtidos neste estudo, esta técnica mostrou-se de grande risco à perda dos embriões e de necessidade de extrema habilidade do técnico ao executá-la. Da mesma forma, a inovulação direta de embriões vitrificados em OPS também requer muita habilidade e sutileza do operador. No entanto, hipoteticamente, a utilização da vitrificação em OPS diminui drasticamente os danos celulares, pois permite o uso de uma menor quantidade de solução (1 $\mu$ L), e um menor tempo de exposição do embrião a solução final de vitrificação, utilizando uma maior taxa de resfriamento devido a um menor diâmetro e finura da parede da palheta. Outro limitante da técnica em OPS baseia-se no contato direto da solução com embrião no nitrogênio líquido, aumentando o risco de contaminação veiculada pelo nitrogênio (FOUNTAIN et al., 1997). Este risco pode ser diminuído utilizando-se o nitrogênio líquido filtrado ou através de esterilização (VAJTA *et al.*, 1998). Além disso, foram desenvolvidas algumas técnicas para selar a OPS, com calor, algodão ou álcool polivinílico, visando a minimização de riscos (LÓPEZ-BÉJAR & LÓPEZ-GATIUS, 2002).

## **7. Conclusões e Implicações**

A vitrificação de embriões ovinos produzidos *in vivo* mostrou ser uma biotécnica eficaz e viável em programas de transferência de embriões. Da mesma forma, a inovulação direta de embriões vitrificados ou congelados são efetivas quanto a taxas de gestação.

A vitrificação propicia melhores taxas de prenhez que a congelação de embriões ovinos em estadio de mórula.

Como implicação, neste momento, o maior desafio será melhorar e estabilizar os resultados, estabelecendo uma padronização universal do método de vitrificação, o qual poderá ser aplicado com sucesso na criopreservação de embriões em diferentes espécies e diferentes estadios embrionários. O futuro da vitrificação em embriões ovinos poderá não ser o de substituir a congelação tradicional, mas sim oferecer uma solução para situações especiais onde não há equipamentos ou ainda, onde outros métodos não produzam resultados satisfatórios.

## 8. Referências Bibliográficas

ARAV, A.; YAVIN, S.; ZERON, Y.; NATAN, D.; DEKEL, I.; GACITUA, H. New trends in gamete's cryopreservation. **Mol. Cell. Endocrin.**, v. 187, p. 77-81, 2002.

BARI, F.; KHALID, M.; HARESIGN, W.; MURRAY, A.; MERREL, B. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. **Theriogenology**, v.59, p.1265-1275, 2003.

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

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

BERTHELOT, F.; MARTINAT-BOTTE, F.; VAJTA, G.; TERQUIT, M. Cryopreservation of porcine embryos: state of the art. **Livestock Prod. Sci.**, v. 83, p. 73-83, 2003.

COCERO, M.J.; DIAZ de la ESPINA, S.M.; AGUILAR, B. Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed ovine embryos using two cryoprotectants. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 1244-1258, 2002.

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

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

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

DATTENA, M.; PTAK, G.; LOI, P.; CAPPAL, P. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1511-1519, 2000.

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

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

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

FOUNTAIN, D.M.; RALSTON, M.; HIGGINS, N.; GORLIN, J.B.; UHL L.; WHEELER C.; ANTIN J.H.; CHURCHILL W.H.; BENJAMIN R.J. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopietic stem cell components. **Transfusion**, v. 37, p. 585-91, 1997.

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

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

ISACHENKO, V.; ALABART J.L.; DATTENA M.; NAWROTH, F.; CAPPAI P.; ISACHENKO, E.; COCERO, M.J.; OLIVEIRA, J.; ROCHE A.; ACCARDO C.; KRIVOKHARCHENKO A.; FOLCH, J. New technology for vitrification and field (microscope free) warming and transfer of small ruminant embryos. **Theriogenology**, v.59, p.1209-1218, 2003.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 42, p. 67-75, 1996.

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

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

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

LÓPEZ-BÉJAR & LÓPEZ-GATIUS. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. **Theriogenology**, v. 58, p. 1541-1552, 2002.

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

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

MARTINO, A.; POLLARD, J.A.; LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 45, p. 503-512, 1996.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 36, p. 49-55, 2001.

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

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

McGINNIS, L.K.; DUPLANTIS, S.C.JR.; YOUNGS C.R. Criopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 30, p. 273-280, 1993.

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

MIYAMOTO, H.; ISHIBASHI. T. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. **J. Reprod. Fertil.**, v. 50, p. 373-375, 1977.

NAITANA, S.; LEDDA, S.; LOI, P.; LEONI, G.; BOLIOLI L.; DATTENA M.; CAPPAL P. Polyvinyl alcohol as a defined for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 48, p. 247-256, 1997.

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

OKADA, A.; WACHI, S.; IIDA, K.; ZYOUZYOU, S.; TOGAWA, M.; ASADA, M.; FUKUI, Y. Birth of lambs after direct transfer of vitrified ovine embryos. **J. Reprod. Dev.**, v. 48, p. 309-312, 2002.

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

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

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

SAEG. (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA) UFV. Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas. Versão 7.0 Viçosa-MG, 2000, 150p. (manual do usuário).

SAKUL, H.; BRADFORD, G.E.; BONDURANT, R.H.; ANDERSON, G.B.; DONAHUE, S.E. Cryopreservation of embryos as a means of germplasm conservation in sheep. **Theriogenology**, v.39, p.401-409, 1993.

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

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

SEIDEL, G.E. Jr. Cryopreservation of equine embryos. *Veterinary Clinics of North America*: **Equine Pract.**, v. 12, n. 1, p. 85-99, 1996.

SELAIVE VILLARROEL, A.B. et al. Experiências preliminares de Transferência de embriões em ovinos. In: Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Porto Alegre, RS, **Proceedings**.....p.5, 1977 (Abstract).

SELAIVE VILLARROEL, A.B.; MIESFILHO, A. Transferência de óvulos fecundados em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.3, p.29-31, 1979.

SHISONG, C.; WRATHALL, A.E. The importance of the zona pelucida for disease control in livestock by embryo transfer. **British Veterinary Journal**, v.145, n., p.19-140, 1989.

SINGH, E.L. The disease control potential of embryos. **Theriogenology**, v.27, n.1, p.9-20, 1987.

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

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

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. Terceira edição. Illinois. Copyright, 1998. 180p.

STOREY, K.B.; STOREY, J.M. Frozen and Alive. **Sci. Anim.**, December, p. 62-67, 1990.

TERVIT, H.R.; GOOLD, P.G. Deep freezing of sheep embryos. **Theriogenology**, v. 21, p.268, 1984 (Abstract).

THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Embryo transfer in small ruminants: the method of choice for health control in germplasm exchanges. **Livestock Prod. Sci.**, v. 62, p. 253-270, 2000.

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

VAJTA, G. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 357-364, 2000.

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

VAJTA, G.; BOOTH, P.J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-Letters**, v. 18, p. 191-195, 1997.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M.; HOLM, P.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE T.; CALLESEN H. A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, p.53-58, 1998.

VAJTA, G.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Factors affecting survival rates of in vitro produced bovine embryos after vitrification and direct in straw rehydration. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 45, p. 191-200, 1996.

VAJTA, G.; MURPHY, C.N.; MACHÁTY, Z.; PRATHER, R.S.; GREVE, T.; CALLESEN, H. In-straw dilution of bovine blastocysts after vitrication with the open pulled straw method. **Vet. Rec.**, v.144, p.180-181, 1999.

WARWICK, B.L.; BERRY, R.O.; HORLACHER, W.R. Results of mating rams to Angora female goats. **Rec. Proc. Amer. Soc. Anim. Prod.**, p.225-227, 1934.

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

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

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

## 9. Anexos

### 9.1. SOLUÇÃO *HOLDING* (HM)

#### Para Congelação

- PBS (Dulbecco - Embriocare)..... 8,0 mL
- SFB (Nutricell)..... 2,0 mL

#### Para Vitriificação

- TCM 199 (GIBCO – cód. 11150-059) ..... 8,0 mL
- SFB (Nutricell)..... 2,0 mL

### 9.2. SOLUÇÃO SM: 0,5M sacarose

- 10 mL solução HM ..... 1,7115g sacarose  
(Sigma – S3929)

Dissolver em banho maria a 40°C.

### 9.3. PREPARO DA PLACA PARA CONGELAÇÃO

- Poço 1: 1.000  $\mu$ L HM
- Poço 2: 950  $\mu$ L HM + 50  $\mu$ L EG (solução 0,5M) (Sigma – E1129)
- Poço 3: 896  $\mu$ L HM + 104  $\mu$ L EG (solução 1,0 M)
- Poço 4: 845  $\mu$ L HM + 155  $\mu$ L EG (solução 1,5M)

### 9.4. PREPARO DA PLACA PARA VITRIFICAÇÃO

- Poço 1: 800  $\mu$ L HM

- Poço 2: 800  $\mu$ L HM
- Poço 3: 800  $\mu$ L HM + 100  $\mu$ L EG (Sigma – E1129) + 100  $\mu$ L DMSO (Sigma –D2650)
- Poço 4: 600  $\mu$ L SM + 200  $\mu$ L EG + 200  $\mu$ L DMSO

#### 9.5. PREPARO DA PLACA PARA DESCONGELACAO EMBRIÕES CONGELADOS

- Poço 1: 800  $\mu$ L SM
- Poço 2: 800  $\mu$ L HM
- Poço 3: 800  $\mu$ L HM

#### 9.6. PREPARO DA PLACA PARA AQUECIMENTO EMBRIÕES VITRIFICADOS

- Poço 1: 400  $\mu$ L HM + 400  $\mu$ L SM
- Poço 2: 560  $\mu$ L HM + 240  $\mu$ L SM
- Poço 3: 800  $\mu$ L HM

**Trabalho científico enviado para publicação na revista *Reproduction in Domestic  
Animals***

Botucatu, Brazil

**VIABILITY OF OPS VITRIFIED SHEEP EMBRYOS AFTER DIRECT  
TRANSFER**

Renata Elisa Green, Bruno Fernandes Sales Santos, Carmen Cecilia Sicherle, Fernanda  
Cruz Landim-Alvarenga, Sony Dimas Bicudo

**Contents**

The aim of this study was to evaluate the effect of OPS vitrified procedure on the viability of sheep embryos after direct transfer. Embryos were produced *in vivo* and cryopreserved by slow freezing or OPS vitrification. The survival rates of cryopreserved embryos were compared with non-frozen counterparts. In a first set of experiments, embryos at morulae and blastocyst stage were frozen in an automatic freezer in ethylene glycol (1.5M), and after thawing, were directly and indirectly transferred to recipient ewes. A second group of embryos were loaded into open pulled straw (OPS) and plunged into liquid nitrogen after exposure at room temperature for 1 min and 45 s in 10% EG + 10% dimethyl sulphoxide (DMSO), then for 30 s in 20% EG + 20% DMSO + 0.5 M sucrose. After warming, embryos were either transferred directly using a French mini straw as the catheter for the transplantation process or after *in vitro* dilution of cryoprotectants (two step process). The pregnancy rate after direct transfer of OPS vitrified embryos was significantly higher than direct transfer of frozen embryos (57.1% versus 34.8%) ( $P=0.07$ ). No significant difference was observed among fresh, frozen or

vitrified embryos on pregnancy rate (50.0%, 38.6% and 55.8%). However, vitrified early cleavage stage embryos (morulae) had a significantly higher viability than that frozen embryos (64.0% versus 38.9%) ( $P=0.07$ ). In conclusion, our results indicate that OPS vitrification technique in association with direct transfer improves the viability of sheep embryos with potential applications to field conditions.

Keywords: Sheep; Embryo; Vitrification; Slow freezing; Embryo transfer

## **Introduction**

Embryo transfer program associated with cryopreservation has the potential to increase the rate of genetic improvement in sheep industry. Storage and transport of embryos can provide the widespread of improved genetic and also contribute to reduce health risk and avoid loss of animals during transport.

Since the first lambs produced from cryopreserved embryos were born in 1976 (Willadsen et al. 1976), cryopreservation of sheep embryos has become widely used in commercial programs (Thompson 1997). The two most widely methods of cryopreservation are controlled slow freezing and vitrification. Vitrification technique involves the addition of higher concentrations of cryoprotectants and very rapid cooling rate (Rall and Fahy 1985), avoiding the detrimental effects of extracellular and intracellular ice crystal formation.

Cooling rates seems to be a key factor in embryo vitrification. An increase in cooling rate decreases chilling injury and may permit a reduction of cryoprotectant concentration (Vajta 2000). Until recently, embryos from several species have been vitrified in straws of 0.25 ml volume. These straws limit the cooling rate to less than

2500°C/min (Rall 1987). The success of vitrification procedures has been enhanced by using open pulled straw (OPS), which increase the cooling rate approximately to 20000°C/min (Vajta et al. 1997).

In the past, vitrification method for sheep embryo cryopreservation has been reported as a viable technique (Ali and Shelton 1993; Naitana et al. 1997; Datenna et al. 2000). After warming, embryos are usually placed in a hypertonic solution to remove the permeating cryoprotectants before transferring them to an isotonic solution. However, few authors have been described the possibility of direct transfer of vitrified embryo in sheep (Baril et al. 2001; Isachenko et al. 2003).

Nowadays, the use of embryo transfer and cryopreservation in breeding schemes is limited due to the excessive cost when compared to the value of the animal. The most widely used technique of cryopreservation of sheep embryos is slow freezing which requires an expensive biological freezer and is labour intensive. However, vitrification techniques with direct transfer offer a real possibility to reduce cost of embryo transfer. This technology has consequently become widely used in commercial embryo transfer programs.

Embryo developmental stage is considered to be a critical factor for the viability of embryo after cryopreservation (Cocero et al. 1996). Embryos at early stage seem to be more difficult to cryopreserve efficiently. This may be due to an intrinsic high sensitivity to freezing (Garcia-Garcia et al. 2006). However, vitrification could be used as an alternative way to increase cryotolerance of these early stages embryos (Vajta 2000).

The objective of the current study was therefore to evaluate the viability of direct transfer of OPS vitrified sheep embryos and the sensitivity of early stage ovine embryos to cryopreservation.

### **Material and Methods**

The experiment described was conducted in Brazil, São Paulo state (November 1006-May 2007) at the embryo transfer centre “Aries – Reprodução e Melhoramento Genético Ovino Ltda.”, at latitude of 22°S.

#### *Embryo recovery*

The embryos were recovered from adult (2- to 6-year-old) Ile de France ewes (n=41), maintained indoor for facilities. Ewes were fed with grass (*Cynodon* sp) twice a day and mineral salt and water *ad libitum*. The oestrus cycles of donors were synchronized using an intravaginal progesterone pessary (Easy Breed – CIDR®, Pfizer, Brazil) on Day 0, which was exchanged for a new one on Day 7 that was maintained until Day 14. Ewes were also given a single dose of 125 µg i.m. cloprostenol (Ciosin®, Coopers, Brazil) at the time of the first FSH dose on Day 12. The superovulatory treatment consisted of eight decreasing doses (40, 30, 20 and 10 mg) of FSH, i.m. (Folltropin-V®, Bioniche, Canada) administered twice daily starting 60 h before pessary removal and finishing 24 h after progesterone withdrawal. Progesterone removal was coincident with the sixth FSH dose and 200 UI of eCG dose (Novormon®, Syntex, Argentina). Oestrus detection was performed with adult teaser after 24 h. Ewes were

artificially inseminated with fresh semen by laparoscopy at 36 h and 45 h after pessary withdrawal.

The embryos were obtained by surgical access to the genital tract, through prepubic laparotomy under general anesthesia with xylazine (Rompun®, Bayer, Brazil, 0.2 mg/kg i.m.) and ketamine (Francotar®, Virbac, Brazil, 7.5 mg/kg i.m.). The ovarian response in terms of the number of corpora lutea was determined by laparoscopy just before the laparotomy, thus avoiding surgery in non-responding females. Embryos were collected on Day 8 after pessary withdrawal. Embryos were obtained by flushing both uterine horns with PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) supplemented with 1.0% foetal calf serum (FCS, Nutricell, Brazil) from the utero-tubal junction toward the base of the uterine horn. Embryos were classified on the basis of conventional morphological criteria and according to their stage of development following the guidelines of the International Embryo Transfer Society. Only excellent and good quality morulae to expanded blastocysts were used in the experiment. Recipients (n=137) were synchronized using a 14-day progestagen sponges containing 60 mg MAP (Progespon®, Syntex, Argentina) and received 500 UI eCG at sponge removal.

#### *Cryopreservation and warming procedures*

##### *Slow freezing and thawing*

Embryos were selected for traditional freezing with ethylene glycol (EG) as the cryoprotectant. All cryoprotectant solutions were prepared in PBS plus 20% FCS. Embryos were first equilibrated in freezing solution consisting successively of 0.5, 1 and 1.5M EG, 5 min each, at room temperature (20°C). During the last equilibrium step,

embryos were loaded into centre of 0.25 ml plastic straw (IMV, L'Aigle, France) within 20-30  $\mu$ l of medium. Embryos were separated from two surrounding segments of holding medium (PBS + 20% FCS) by air bubbles. The straws were sealed and placed in a programmable freezer (TK 2000®, Nutricell, Brazil) and cooled from room temperature (20°C) to -6°C at 3°C/min. After 5 min, each straw were manually seeded. Following further 10 min at -6°C, straws were cooled to -32°C at a rate of 0.5°C/min, and finally after 5 min at this temperature, the straws were plunged and stored into liquid nitrogen. For thawing, straws were held in air for 10 seconds and then dipped into 37°C water bath for at least 20 s. In one group of embryos (indirect transfer), the content of each straw was emptied into a 4-well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) containing 0.5M sucrose in holding medium. After 5 min, the embryos were washed twice in holding medium without sucrose for 5 min each to eliminate cryoprotectants before transfer. Another group of embryos (direct transfer), the straws were shaken and directly transfer after thawing.

#### *OPS vitrification and warming*

The OPS vitrification technique was applied according to the method described by Vajta et al. (1998a). Embryos were first equilibrated in holding medium (HM, TCM 199 + 20% FCS) for 5 min, then in a freezing solution consisting of 10% EG and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in HM for 1 minute and 45 seconds. They were then transferred with approximately 1 or 2  $\mu$ L of solution into 20  $\mu$ L droplet of 20% EG, 20% DMSO and 0,5 M sucrose in HM. Embryos were drawn up together in another 1-2  $\mu$ L drop, loaded by capillarity into narrow end of an OPS and plunged into liquid nitrogen.

The time between the contact of the embryos with concentrated cryoprotectant solution and the liquid nitrogen did not exceed 30 s. For warming, in the first group (indirect transfer) the straws were held in air for 3 s before the narrow end was immersed in HM with 0.25 M sucrose. After 5 min, embryos were transferred for 5 min in HM with 0.125 M sucrose, following by 5 min in HM without sucrose before transferred. In the second group (direct transfer), the OPS were held in air 3 s before the narrow end was slipped into the 0.25 ml straw loaded with two columns of HM plus 0.5 M sucrose separated by 3 cm air bubble and leaving a 0.5 cm empty space at the open end. The OPS was kept into 0.25 ml straw for four seconds for warming and dilution of the medium. The embryo was expelled from the pulled straw when the pulled straw was removed from the 0.25 ml straw. The embryos were then transferred.

#### *Transfer methods*

In all groups, embryos were transferred into synchronized recipients 8 days after sponge removal. The non-cryopreserved embryos were transferred directly into recipients after recovery from donors. The recipients were sedated with 0.3 mg/kg i.m. acepromazine (Acepran®, Univet, Brazil). After endoscopic control of the presence of at least one functional corpora lutea, embryos were transferred as follows. For each recipient just one embryo was transferred.

#### *Indirect transfer*

After warming and cryoprotectant removal, the embryo quality was evaluated under stereomicroscope according to morphological criteria. For each recipient one

embryo was aspirated with 20  $\mu$ L holding media in a unopette connected to a 1 mL syringe and was introduced by semi-laparoscopy into the top of the uterine horn ipsilateral to the ovary bearing at least one functional corpora lutea.

#### *Direct transfer*

After warming, the whole content of the straw (250  $\mu$ L, one embryo) was deposited by semi-laparoscopy into the uterine horn ipsilateral to the ovary bearing at least one functional corpora lutea without embryo selection or cryoprotectant removal.

#### *Pregnancy rate*

Pregnancy was diagnosed 30 days after transfer by transretal ultrasonography, using Aloka 500 (Aloka, Tokio, Japan) with a 5.0-Mhz linear array transducer.

#### *Experimental design*

A total of 137 *in vivo* produced sheep embryos, which were classified as good or excellent by morphological criteria, were obtained. Morulae and blastocysts were distributed into three groups randomly. In the first group, fifty non-cryopreserved embryos were transfer to recipients as counterpart. In group 2, forty four embryos were cryopreserved by slow freezing method. These embryos were also divided into different group of transfer, which twenty one frozen embryos were transferred indirectly and twenty three were transferred directly. In the third group, forty three embryos were vitrified using OPS. Then twenty two were transferred indirectly and twenty one were transferred directly. Pregnancy rates were recorded.

### *Statistical analysis*

The study was designed to compare two cryopreservation methods, two different technique of embryo transfer and the effect of embryo stage on pregnancy rate. The data was analyzed using Wilcoxon and Kruskal-Wallis test as appropriated.

### **Results**

A total of 43 cryopreserved embryos were warmed and each embryo evaluated had good quality to be transferred. Nevertheless, just three embryos with disrupted membrane were found and even though they were transferred. The rate of pregnancy obtained in each treatment is showed in Table 1. There were no statistically significant differences among fresh, frozen and vitrified embryos on pregnancy rate.

After indirect transfer, there was no significant difference between cryopreservation techniques: 54.5% versus 42.9% of pregnancy rates were obtained with OPS vitrification and slow freezing. However, direct transfer of vitrified/warmed embryos resulted in higher pregnancy rate (57.1%) than those frozen/thawed embryos (34.8%) (P=0.07, Table 2).

The ability of embryos to survive the cryopreservation procedure was affected by their developmental stage (Table 3). A significant increased was obtained with vitrification of morulae embryos (64.0%, P=0.07). However, vitrification of blastocysts resulted in a similar pregnancy rate compared with frozen embryos.

### **Discussion**

In the present study, embryo survival was studied to compare slow freezing and OPS vitrification *in vivo* produced sheep embryos followed by either direct transfer into recipient, without cryoprotectant removal, or after indirect transfer after *in vitro* cryoprotectant removal and embryo quality evaluation. According to the results obtained in this experiment, direct transferring OPS vitrified *in vivo* derived sheep embryos appears to be efficacious. The pregnancy rate of OPS vitrified embryos following direct transfer was higher than that frozen embryos. It has been reported similar results using direct transfer of OPS vitrified embryos (Isachenko et al. 2003) and 0.25 mL straw vitrified embryos (Baril et al. 2001).

The pregnancy rates following transfer of fresh (50.0%), frozen (38.6%) and vitrified (55.8%) embryos were not significant different but were considerably lower than those reported by other authors (Ali and Shelton 1993; Dattena et al. 2000; Baril et al. 2001; Dattena et al. 2004). However, some groups only transfer blastocysts that re-expand after cryopreservation and warming, unlike the present experiment where all embryos were transferred.

The pregnancy rate of fresh embryos was considerably lower than that achieved by other groups. It has been reported that *in vivo* ovine embryos range from 70% to 90% of pregnancy rate following fresh transfer (Dattena et al. 2000; Papadopoulos et al. 2002; Martinez et al. 2006). However, our lower results can be due to the interval between the flushing and transfer of embryos or intrinsic factors of recipients.

It is desirable that cryopreserved embryos are transferred into the uterus as soon as possible, and the interval between post-thawing and transfer has a large influence on the subsequent viability. The stepwise for warming embryos requires a long time until

transfer and the many manipulations may affect embryonic survival (Okada et al. 2002). Dattena et al. (2004) reported no difference in embryo viability whether one or three dilution steps were employed. In contrast, in direct embryo transfer, embryos are deposited into uterus immediately after warming and thus, the factors that decrease viability before transfer are avoided. Despite of low overall survival rates obtained in this experiment, direct transfer seemed to be as effective as stepwise embryo transfer of frozen and vitrified embryos. Direct transfer can be performed without specific expertise in embryo quality evaluation, reducing the cost of transfer, avoiding embryo elimination after thawing and simplifying the embryo transfer method in field conditions. Moreover, this technique allows a potential gain of 7-8% in terms of lambs born which could increase the gain/cost ratio (Baril et al. 2001).

The rate of cryosurvival of sheep embryos at different developmental stages assessed in the current study indicates that vitrification procedure may increase the viability of early stages, which are highly sensitive to freezing procedure (Garcia-Garcia et al. 2006). Embryos at early stage seem to be more difficult to cryopreserve efficiently and this may be due to an intrinsic high sensitive to freezing (Massip 2001). Additionally, Vajta (2000) suggested that vitrification could be used as an alternative way to increase cryotolerance of these early stages embryos, which is in agreement with our study.

The advantages of the method we proposed are that by directly plunging into liquid nitrogen, the embryos are rapidly cooled in the fine portion of the open-pulled straw, which is approximately 8-fold faster than those achieved in 0.25 mL straw (Vajta 2000). Also, warming is easily and rapidly by directly immersing the OPS in a 0.25 mL straw containing the thawing medium; and embryo transfer is directly performed using

the 0.25 mL straw, without the need for optical equipment. However, the major limit to the application of OPS vitrification is the direct contact between the medium containing the embryos and the liquid nitrogen, which may be a source of contamination (Fountain et al. 1997). These dangers may be eliminated by using sterile liquid nitrogen which might be too complicated for everyday application (Vajta et al. 1998b). Another possibility is to use even more narrow and thin-walled straws than OPS and to heat-seal them as used for normal straws (Vajta 2000). Nevertheless, Dattena et al. (2004) haven't reported any problem using direct transfer of embryos in OPS into non-sterile liquid nitrogen.

In conclusion, the present results indicate that direct transfer of OPS vitrified sheep embryos could be very effective in field conditions and offer a real advantage for embryo biotechnology by reducing cost of embryo transfer. Furthermore, it is necessary to improve the success of ovine embryo cryopreservation protocols and establish a universal standardized vitrification method, if this technology is to be exploited commercially for embryo transfer programs.

### **Acknowledgements**

The authors are grateful to Adriana Piccinin for statistical assistance and the staff of Embryo transfer centre "Aries". We wish to thank sincerely Jorge Luis Green, sheep breeder at Fazenda Campo Verde for the supply of the animals used in this study and the financial support.

### **References**

Ali J., Shelton J.N., 1993. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 99, p. 471-477.

Baril F., Traldi A-L., Cognié Y., Leboeuf B., Bechers J.F., Mermillod P., 2001. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, 56, p.147-155.

Cocero, M.J.; Sebastian, A.L.; Barragan, M.L.; Picazo, R.A., 1996. Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology*, 33, 502-507.

Dattena M., Ptak G., Loi P., Cappai P., 2000. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, 53, p.1511-1519.

Dattena M., Accardo C., Pilichi S., Isachenko V., Mara L., Chessa B., Cappai P., 2004. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology*, 62, p. 481-493. Fountain D.M., Ralston M., Higgins N., Gorlin J.B., Uhl L., Wheeler C., Antin J.H., Churchill W.H., Benjamin R.J., 1997. Liquid nitrogen freezers: a potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion*, 37, p. 585-591.

Garcia-Garcia R.M., Gonzalez-Bulnes A., Dominguez V., Veiga-Lopez A., Cocero M.J., 2006. Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. *Cryobiology*, 52, 108-113.

Isachenko V., Alabart J.L., Dattena M., Nawroth, F., Cappai P., Isachenko, E., Cocero, M.J., Oliveira, J., Roche A., Accardo C., Krivokharchenko A., Folch, J., 2003. New

technology for vitrification and field (microscope free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*, 59, 1209-1218.

Martinez, A.G.; Valcarcel, A.; Furnus, C.C.; De Matos, D.G.; Iorio, G.; De Las Heras, M.A., 2006. Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Rum. Res.*, 63, 288-296.

Massip A, 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim.*, 36, 49-55.

Naitana S., Ledda S., Loi P., Leoni G. Bolioli L., Dattena M., Cappai P., 1997. Polyvinyl alcohol as a defined for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. *Anim. Reprod. Sci.*, 48, 247-256.

Okada A., Wachi S., Iida K., Zyouzyou S., Togawa M., Asada M., Fukui Y, 2002. Birth of lambs after direct transfer of vitrified ovine embryos. *J. Reprod. Dev.*, 48, 309-312.

Papadopoulos, S.; Rizos, D.; Duffy, P.; Wade, M.; Quinn, K.; Boland, M.P.; Lonergan, P., 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.*, 74, 35-44.

Rall W.F., Fahy G.M, 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature*, 313, 573-575.

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

Thompson J.G., 1997. Comparison between in vivo derived and in vitro-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants (review). *Reprod. Fert. Dev.* 9 341-354.

Vajta G., 2000. Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61, 357-364.

Vajta G., Kuwayama M., Holm P., Booth P.J., Jacobsen H., Greve T., Callesen H., 1998a. A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification. *Mol. Reprod. Dev.*, 51, 53-58.

Vajta G., Lewis E.M., Kuwayama M., Greve T., Callesen H., 1998b. Sterile application of the Open Pulled Straw (OPS) vitrification method. *Cryo-Lett.* 19, 389-392.

Vajta, G., Booth, P.J., Holm, P. Greve, T., Callesen, H., 1997. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters*, 18, 191-195.

Willadsen S.M., Polge C., Rowson L.E.A., Moor R.M., 1976. Deep freezing of sheep embryos. *J. Reprod.Fert.* 46, 151-154

Author's address (for correspondence): Renata E. Green, Department of Veterinary Reproduction and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil. Zip Code 18618-000. E-mail: renata\_green@hotmail.com

## Tables

Table 1

Pregnancy rate of in vivo produced sheep embryos after of fresh, frozen or vitrified embryos.

Embryos transferred	Transferable/thawed	Recipients	Pregnancy rate
---------------------	---------------------	------------	----------------

	embryos	(n)	(%)
Fresh	50/50	50	50.0
Frozen	44/44	44	38.6
OPS	43/43	43	55.8

No statistically significant differences among groups were found (P= 0.15).

Table 2

Pregnancy rate after direct and indirect transfer of frozen or vitrified embryos.

Cryopreservation technique	Transfer	Recipients (n)	Embryos transferred (n)	Pregnancy rate (%)
Slow freezing	Direct	23	23	34.8 <sup>b</sup>
	Indirect	21	21	42.9
OPS vitrification	Direct	21	21	57.1 <sup>a</sup>
	Indirect	22	22	54.5

Values with different superscripts (a and b) differ significantly (P=0.07).

Table 3

Pregnancy rate after transfer of frozen or vitrified embryos according to the developmental stage of the embryos.

Cryopreservation technique	Embryo stage	Embryos transferred (n)	Pregnancy rate (%)
Slow freezing	Morulae	18	38.9 <sup>b</sup>
	Blastocysts	25	36.0
OPS vitrification	Morulae	25	64.0 <sup>a</sup>
	Blastocysts	18	44.4

Values with different superscripts (a and b) differ significantly (P=0.07).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)