

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARLOS RENATO DE FREITAS GUAITOLINI**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES CANINOS POR  
CONGELAÇÃO LENTA**

**ALEGRE – ES**

**2011**

**CARLOS RENATO DE FREITAS GUAITOLINI**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES CANINOS POR  
CONGELAÇÃO LENTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de **Mestre em Ciências Veterinárias**, linha de pesquisa em Biotécnicas e Fisiopatologia da Reprodução.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rezende Luz

**ALEGRE – ES**

**2011**

**CARLOS RENATO DE FREITAS GUAITOLINI**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES CANINOS POR CONGELAÇÃO  
LENTA**

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovado em 21 de fevereiro de 2011.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo Rezende Luz  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES  
Orientador

---

Prof. Dr. João Henrique Moreira Viana  
Embrapa Gado de Leite

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Denise Lopes  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
UNESP - Botucatu - SP

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Candia Nunes da Cunha  
Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy  
Ribeiro"- UENF - Campos dos Goytacazes - RJ

**Pai, Mãe e Marilda.  
Pessoas importantes que eu amo.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Renato Luiz Guaitolini e Maria de Lourdes Freitas Guaitolini, pela educação que me deram e pelo amor.

A Marilda, sempre ao meu lado em todos os momentos, me fazendo seguir em frente com seus incentivos.

Aos meus sogros, Miguel Jair Taffarel e Jovilde Inês Taffarel, pela torcida, mesmo que de longe.

A Marília, Marcelo e Daiana, tenho certeza que sempre torceram, minhas sobrinhas emprestadas Beatriz e Isabela pelos sorrisos e abraços.

Ao Prof. Dr. Marcelo Rezende Luz, pela orientação, paciência e amizade. Obrigado por acreditar em mim.

A Profa. Dra. Patrícia Maria Coletto Freitas, pela amizade e ensinamentos.

Aos amigos de mestrado, Marcelão, Ana Elisa, Lívia, Natália, Vagner, Leonardo, Leonardo Trivilin, foram bons momentos que passamos juntos.

A Profa. Dra. Maria Denise Lopes e Profa. Dra. Fenanda de Cruz Landim-Alvarenga, muito obrigado pelos ensinamentos e por abrirem as portas de seus laboratórios para que eu pudesse realizar parte deste trabalho.

Ao Mateus José Sudano, muito importante durante a descongelação dos embriões e análise estatística. Muito obrigado.

Aos novos amigos de Botucatu, Guilherme, Erika, Neto, Sharlene, Flávia e Fábio André obrigado pela amizade e companheirismo.

A Madalena pela assistência durante o mestrado e aos funcionários do Hospital Veterinário da UFES.

A CAPES-REUNI pela concessão da bolsa de estudo.

*Ninguém pode ser escravo de sua identidade:  
quando surge uma possibilidade de mudança é preciso mudar.*

**Elliot Gould**

## RESUMO

O aumento da demanda em reprodução assistida de cães, bem como a crescente preocupação com a preservação de espécies ameaçadas de extinção têm impulsionado as pesquisas com reprodução canina, e o uso do cão como modelo experimental, em muitos casos, é um modelo mais relevante que os tradicionalmente utilizados para humanos. Além disso, a criopreservação de embriões caninos ainda é um desafio para a comunidade científica. Objetivou-se com este estudo avaliar as taxas de reexpansão da blastocele, taxas de eclosão, a viabilidade embrionária pós-descongelação e o desenvolvimento *in vitro* de blastocistos caninos criopreservados em glicerol 10% (GLI) e em etilenoglicol 1,5M (EG), por congelação lenta. Foram recuperadas 72 estruturas embrionárias e um total de 125 corpos lúteos foram identificados nos ovários, perfazendo uma taxa de recuperação embrionária de 57,6%. As concentrações plasmáticas de progesterona foram de  $4,57 \pm 3,77$  ng/mL no dia 0 (primeira cópula ou inseminação artificial) e  $28,56 \pm 3,21$  ng/mL no dia 12 (dia da colheita dos embriões). Cinquenta e um blastocistos foram separados aleatoriamente em dois grupos, GLI (n=26) e EG (n=25). Cada grupo foi subdividido em três (M0 = avaliação imediatamente após a descongelação, GLI = 9 e EG = 9; M3 = avaliação três dias após a descongelação e cultivo *in vitro*, GLI = 8 e EG = 8; e M6 = avaliação seis dias após a descongelação e cultivo *in vitro*, GLI = 9 e EG = 8). A criopreservação dos embriões foi realizada em máquina de congelação programável, em curva de resfriamento decrescente de 0,6°C até a temperatura de -35°C. Imediatamente após a descongelação, os embriões do M0 foram corados com a associação das sondas fluorescentes iodeto de propídeo (125 µg/ml) e Hoechst 33342 (1mg/ml) para avaliação da viabilidade celular; os embriões do M3 e M6 foram descongelados, cultivados *in vitro* em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar a uma temperatura de 38,5°C, em meio SOFaa acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), por três e seis dias, respectivamente, e corados de forma similar. A taxa de reexpansão da blastocele após 24h de cultivo *in vitro* não diferiu (P = 0,6196) entre os grupos GLI (76,5%) e EG (68,8%), respectivamente. Não foi observada eclosão embrionária em ambos os grupos. As taxas de viabilidade embrionária pós-descongelação dos



grupos GLI e EG foram de  $60,6 \pm 9,7$  e  $64,4 \pm 9,9$ , respectivamente, e não diferiram ( $P = 0,8275$ ). Além disso, não foi verificada diferença ( $P = 0,3105$ ) na viabilidade embrionária entre os momentos M0 ( $61,1 \pm 11,6\%$ ), M3 ( $50,0 \pm 12,4\%$ ) e M6 ( $76,4 \pm 12,0\%$ ). Conclui-se que a taxa de reexpansão da blastocela pode ser um indicativo de viabilidade embrionária pós-descongelamento; que não há eclosão de blastocistos caninos criopreservados em glicerol 10% ou etilenoglicol 1,5M por congelamento lento e cultivados *in vitro* em meio SOFaa por até 6 dias; que blastocistos caninos criopreservados em glicerol 10% ou etilenoglicol 1,5M, por congelamento lento, apresentam viabilidade similar pós-descongelamento e mantêm-se viáveis por até seis dias em cultivo *in vitro*.

**Palavras-chave:** criopreservação, glicerol, etilenoglicol, viabilidade embrionária, cadela.

## ABSTRACT

The raising necessity of assisted reproduction technology in dogs, as well as the increasing deep concern for preservation of endangered species has urged the research with canine species, and the use of the dog as an experimental model, in many cases, is a more relevant model than the traditionally used for human-being. Moreover, canine embryo cryopreservation is still a challenge for the scientific community. The aim of this study was to evaluate the blastocoele re-expansion rates, hatching rates, post-thawing embryonic viability and the in vitro development of canine blastocysts cryopreserved in glycerol 10% and ethylene glycol 1.5M, by slow freezing. A total of 72 embryonic structures were recovered and 125 corpora lutea were identified, performing an embryonic recovery rate of 57.6%. Plasmatic progesterone concentrations were  $4.57\pm 3.77$  ng/ml on day 0 (first mating or artificial insemination) and  $28.56\pm 3.21$  ng/mL on day 12 (embryo collection day). Fifty-one blastocysts were randomly allocated into two groups, GLY (n=26) and EG (n=25). Each group was subdivided into three subgroups (M0 = embryonic evaluation immediately after thawing, GLY = 9 and EG = 9; M3 = embryonic evaluation three days after thawing and in vitro culture, GLY = 8 and EG = 8; and M6 = embryonic evaluation six days after thawing and in vitro culture, GLY = 9 and EG = 8). For embryo cryopreservation, a programmable freezer was used, with a cooling-rate curve of  $0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , until  $-35^{\circ}\text{C}$ . Immediately after thawing, embryos from M0 were stained with the association of the probes propidium iodide (125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and Hoechst 33342 (1mg/ml) for cellular viability evaluation; embryos from M3 and M6 were thawed and transferred to synthetic oviduct fluid (SOF) + 10% FCS. Dishes were incubated at  $38.5^{\circ}\text{C}$  under an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  with maximum humidity, for three and six days, respectively, and similar stained. Blastocoele re-expansion rates after 24h of in vitro culture did not differ ( $P = 0.6196$ ) between GLY (76.5%) and EG (68.8%), respectively. No embryonic hatching was observed in both groups. Post-thawing embryonic viability rates were  $60.6\pm 9.7$  and  $64.4\pm 9.9$  for GLY and EG, respectively, without significant difference ( $P = 0.8275$ ). In addition, there was no significant difference among moments M0 ( $61.1\pm 11.6\%$ ), M3 ( $50.0\pm 12.4\%$ ) and M6 ( $76.4\pm 12.0\%$ ) for embryonic viability. The present study indicates that blastocoele re-

expansion serves as an indicator of post-thawing embryonic viability; that canine blastocysts cryopreserved in glycerol 10% or ethylene glycol 1.5M by slow freezing and cultured in SOFaa medium for 6 days do not hatch in vitro; that canine blastocysts cryopreserved in glycerol 10% or ethylene glycol 1.5M by slow freezing present similar post-thawing viability, and remain viable for up to six days on in vitro culture.

**Key words:** cryopreservation, glycerol, ethylene glycol, embryonic viability, bitch.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1 – Aparência morfológica (A,C,E,G) e após coloração pelo Iodeto de Propídeo e Hoechst 33342 (B,D,F,H) de blastocistos caninos a fresco (A,B), imediatamente após a descongelação (C,D), cultivados *in vitro* por 3 (E,F) ou 6 (G,H) dias pós-descongelação. A, C, E e G - aumento de 10X; B, D, F e H – aumento de 400X. Fonte da imagem B - Derussi (2009).....41

### Apêndice I

Figura 2 – A – Blastocisto canino criopreservado em glicerol 10% imediatamente após a descongelação (aumento de 10X), B – o mesmo embrião corado com iodeto de propídeo e Hoechst 33342 (aumento de 100X).....63

Figura 3 – A - Blastocisto canino criopreservado em etilenoglicol 1,5M (aumento de 10X - seta vermelha) imediatamente após a descongelação; B – 24 horas após (aumento de 10X - seta vermelha); C – 48 horas após (aumento de 10X - seta vermelha); D – 72 horas após (aumento de 10X - seta vermelha) e E – 144 horas após a descongelação (aumento de 10X - seta vermelha); F – o mesmo embrião corado com iodeto de propídeo e Hoechst 33342 (aumento de 100X).....64

## LISTA DE QUADROS

Anexo III

Preparo do meio de cultivo SOFaa

Soluções estoque.....61

SOF estoque.....61

SOF final.....62

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

Tabela 1 – Viabilidade embrionária (%) pós-descongelamento de embriões caninos criopreservados em glicerol 10% (GLI) ou etilenoglicol 1,5M (EG), e corados com iodeto de propídeo e Hoechst 33342 imediatamente (M0), três dias (M3) ou seis dias (M6) após a descongelamento.....39

### Apêndice II

Tabela 2 – Porcentagem de embriões caninos viáveis pós-descongelamento nos diferentes tratamentos (Glicerol 10% e Etilenoglicol 1,5M), corados com iodeto de propídeo e Hoechst 33342 imediatamente após a descongelamento (M0), após três dias (M3) ou seis dias (M6) de cultivo *in vitro*.....65

## **BIOGRAFIA**

CARLOS RENATO DE FREITAS GUAITOLINI, filho de Renato Luiz Guaitolini e Maria de Lourdes Freitas Guaitolini, nascido em Vila Velha, Espírito Santo, em 24 de Junho de 1981.

Iniciou o curso de Medicina Veterinária em Março de 2000 no Centro Universitário Vila Velha (UVV), graduando-se em 13 de Dezembro de 2004.

Em março de 2005 começou a trabalhar na área comercial como promotor técnico nos estados de Mato Grosso e Espírito Santo, nas empresas Motivar Comércio LTDA e Ourofino Saúde Animal, atuando até março de 2009. De agosto de 2006 a janeiro de 2008 foi sócio da Pró-Vida Clínica Veterinária, Cuiabá – MT.

Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, nível Mestrado, em março de 2009, na Universidade Federal do Espírito Santo – Campus Alegre.

## LISTA DE SIGLAS e/ou ABREVIATURAS

- IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza;  
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis;  
CTE – Células-tronco embrionárias;  
PM – Peso molecular;  
DMSO – Dimetilsulfóxido;  
EG – Etilenoglicol;  
GLI – Glicerol;  
TUNEL – *Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick End Labeling*;  
IP – Iodeto de propídeo;  
M0 – Momento 0 (avaliação imediatamente após a descongelação);  
M3 – Momento 3 (avaliação três dias após a descongelação);  
M6 – Momento 6 (avaliação seis dias após a descongelação);  
SOFaa – Fluido sintético de oviduto com aminoácidos;  
SFB – Soro fetal bovino;  
N<sub>2</sub>L – Nitrogênio líquido;  
DPBS – Solução salina fosfatada tamponada de Dulbecco's;  
BSA – Albumina sérica bovina;  
TCM199 – Meio de cultivo de tecidos 199.



## SUMÁRIO

1. Introdução .....	19
2. Revisão de Literatura .....	21
2.1. O cão como modelo experimental.....	21
2.2. Princípios de Criopreservação Embrionária.....	22
2.2.1. Congelação lenta .....	24
2.2.2. Conteúdo lipídico <i>versus</i> criopreservação embrionária .....	26
2.2.3. Avaliação <i>in vitro</i> de embriões criopreservados.....	28
3. Capítulo 1 – Viabilidade <i>in vitro</i> de blastocistos caninos criopreservados por congelamento lento .....	30
Resumo .....	31
Abstract .....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos .....	34
Delineamento experimental .....	34
Animais e embriões .....	34
Colheita dos embriões.....	34
Congelação e descongelamento dos embriões.....	35
Avaliação da viabilidade embrionária pós-descongelamento .....	36
Cultivo <i>in vitro</i> .....	36
Dosagem hormonal.....	36
Análise estatística.....	37
Resultados e Discussão.....	37
Agradecimentos.....	43

Referências .....	43
4. Conclusões Gerais .....	47
Referências .....	48
Anexo I .....	59
Técnica de congelação dos embriões .....	59
Anexo II .....	60
Técnica de coloração dos embriões .....	60
Anexo III .....	61
Preparo do meio de cultivo SOFaa .....	61
Apêndice I – Figuras .....	63
Apêndice II – Tabela .....	65

## 1. Introdução

Atualmente, a tecnologia de criopreservação de embriões é aplicada de forma industrial em bovinos, e alcançou 823.134 transferências de embriões a fresco e criopreservados, no ano de 2007 em todo o mundo (THIBIER, 2008). Segundo Leibo e Songsasen (2002), milhões de animais domésticos e de laboratório foram produzidos nos últimos 25 a 35 anos com uso de gametas e embriões criopreservados, e estes métodos estão agora sendo aplicados com maior frequência e urgência para preservar gametas e embriões de animais em vias de extinção, por meio da formação de “bancos genômicos” ou “zoológicos congelados”. Assim, métodos padrões (“*Standards*”) de criopreservação podem ser adequados para agir como uma forma “temporária” de preservar germoplasma de espécies não-domésticas, até que se adquiram maiores conhecimentos sobre estas espécies (HEWITT e ENGLAND, 2001; LEIBO e SONGSASEN, 2002).

Durante o resfriamento e congelação embrionária, os danos podem ser distinguidos de acordo com as diferentes temperaturas que as células passam. Em temperaturas entre +15 e -5° C, o dano pelo frio é o principal fator, prejudicando principalmente as gotículas lipídicas citoplasmáticas e os microtúbulos. Estes danos são sempre irreversíveis e contribuem para a morte de oócitos e embriões ricos em lipídios. Entre -5 e -80° C, a principal fonte de prejuízos consiste na formação de cristais de gelo intra e extracelular, enquanto que entre -50 e -150° C ocorrem danos à zona pelúcida ou citoplasma, embora seu mecanismo e a temperatura de ocorrência não estejam inteiramente definidos. Armazenamento inferior a -150° C é provavelmente a fase menos perigosa do processo de criopreservação (VAJTA e NAGY, 2006).

A manutenção da diversidade genética nas espécies é dependente de sua reprodução (Wildt, 1989). Assim, a reprodução assistida apresenta-se como uma das ferramentas utilizadas nos programas de conservação (MATTOS, 2004).

Os carnívoros, por estarem no topo da cadeia alimentar, têm grande importância ecológica, pois podem regular a população de presas naturais e, desta forma, influenciar toda a dinâmica do ecossistema em que vivem (PLANO DE AÇÃO, 2004). Dentre as espécies de canídeos brasileiros classificados como ameaçados ou quase ameaçados de extinção pela União Internacional para Conservação da

Natureza (IUCN) e o IBAMA, têm-se nove espécies, como por exemplo, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), o cachorro-do-mato (*Speothos venaticus*) e o cachorro-do-mato-de-orelha-curta (*Atelocynus microtis*) (PLANO DE AÇÃO, 2004).

A importância dos animais de estimação na sociedade e as preocupações para a preservação de espécies ameaçadas de extinção têm dado um impulso ao uso do cão como modelo experimental (LUVONI, 2000). Em muitos casos o cão pode ser um modelo experimental mais relevante do que camundongos, devido ao seu tamanho, tempo e modo de vida, e fisiologia semelhante na reatividade a drogas e irradiação, quando comparados aos seres humanos. De quase 400 doenças hereditárias conhecidas no cão, mais de 50% (224) têm equivalente na espécie humana, tais como as cardiomiopatias, distrofia muscular e câncer de próstata (CHASTANT-MAILLARD et al., 2010). O cão já foi utilizado como modelo experimental para transplantes em humanos (KIRK et al., 2003); é a espécie animal mais utilizada para testar a eficácia de novas terapias, pelas semelhança com as características clínicas das doenças humanas, para estudos comparativos de câncer hereditário e esporádico entre homens e cão (STARKEY et al., 2005); em terapias gênicas, devido a vida longa do cão que permite o acompanhamento por longos períodos, e em transplante de células-tronco, pela biologia compatível com humanos (HORN et al., 2004). Na aplicação de células-tronco embrionárias em medicina regenerativa, é necessário testar a eficácia e a segurança de tecidos derivados destas células (SCHENEIDER et al., 2010).

Objetivou-se com este estudo avaliar as taxas de reexpansão da blastocelule, as taxas de eclosão embrionária *in vitro*, a viabilidade embrionária pós-descongelamento com o auxílio das sondas fluorescentes Hoechst 33342 e iodeto de propídeo, bem como o desenvolvimento *in vitro* de embriões caninos criopreservados em glicerol 10% e etilenoglicol 1,5M, por congelamento lento.

## **2. Revisão de Literatura**

### **2.1. O cão como modelo experimental**

O cão apresenta uma fisiologia mais adequada para comparação com o ser humano do que muitos modelos tradicionalmente utilizados (STARKEY et al., 2005), mostrando-se um modelo experimental promissor para o estudo de doenças humanas (SCHNEIDER et al., 2008). O melhor argumento para a utilização de cães como modelo experimental para o estudo de doenças é que a ocorrência das mesmas, tanto no cão assim como no homem, são natural, biológica, histologicamente e de curso clínico semelhantes. O controle da biologia do embrião canino e de biotécnicas, como a produção, cultivo e transferência embrionária, permitirão o acesso à tecnologia de células-tronco embrionárias (CTE), primeiro passo para a terapia celular e um dos maiores desafios terapêuticos na espécie humana. Cinco linhagens de CTE caninas estão disponíveis, e foram diferenciadas com sucesso em vários tipos de células, como neurônios, células epiteliais, fibroblastos, células miocárdicas e células progenitoras hematopoiéticas. (SCHNEIDER et al., 2007; CHASTANT-MAILLARD et al., 2010).

As células-tronco embrionárias derivadas da massa celular interna do embrião ou de células germinativas fetais podem manter-se em estado indiferenciado por repetidas culturas. Essas linhagens de células-tronco foram estabelecidas primeiramente em camundongos (HATOYA et al., 2006). Teoricamente, o potencial ilimitado de proliferação e desenvolvimento deste tipo celular oferece uma oportunidade considerável para aplicações em medicina regenerativa e engenharia tecidual. No entanto, existem alguns problemas que devem ser solucionados antes de tecidos derivados de células-tronco embrionárias serem usados para tratar doenças humanas (HAYES et al., 2008). Um dos obstáculos a ser vencido é a capacidade de controlar com eficiência a diferenciação celular em precursores transplantáveis. Isso se faz necessário para reduzir a possibilidade de desenvolvimento de tumores derivados de células-tronco embrionárias. Outro problema é a rejeição do tecido transplantado, portanto faz-se necessário o estabelecimento de métodos para evitar esta rejeição (HAYES et al., 2008).

Protocolos desenvolvidos no cão para estabelecer tolerância e superar a rejeição do enxerto têm sido aplicados com sucesso no homem. Além disso, os resultados a longo prazo de transplante de órgãos ou células hematopoéticas em cães previu com precisão os resultados em pacientes humanos (HAYES et al., 2008).

Martinello et al. (2010) avaliaram a criopreservação de células-tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo canino. A capacidade de diferenciação celular foi avaliada tanto em células a fresco como em células criopreservadas, e os resultados demonstraram que o potencial de diferenciação não foi alterado, comprovando que a criopreservação é um método eficiente de conservação dessas células.

Durante muito tempo, as pesquisas na área de biotecnologia da reprodução se concentraram em estudos com animais de produção. Com o interesse da comunidade científica pela preservação da biodiversidade é que a espécie canina mereceu atenção. Esse aspecto deveu-se ao fato de a fêmea canina constituir-se modelo experimental para canídeos ameaçados de extinção, dentre eles o cachorro vinagre (*Spheothos venaticus*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), que são espécies da fauna brasileira (RIBEIRO, 2007). Entretanto, há no mundo todo, muitas espécies de canídeos ameaçados de extinção, e com isso tornou-se cada vez mais importante o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial, maturação e fertilização *in vitro*, transferência de embrião, para a conservação do material genético destas espécies (JALKANEN e LINDEBERG, 1998, LUVONI, 2000). Além disso, a criopreservação de embriões caninos ainda é um desafio para os cientistas (ABE et al., 2010; CHASTANT-MAILLARD et al., 2010; LUZ et al., 2010).

## **2.2. Princípios de Criopreservação Embrionária**

A estratégia de criopreservação de embriões é baseada em dois fatores: uso de crioprotetores e taxas de resfriamento e aquecimento. Desde o primeiro sucesso na criopreservação de embriões de camundongos (Whittingham et al., 1971), os métodos mais utilizados são a congelação lenta e a vitrificação. Com algumas

exceções, os processos de armazenamento, resfriamento e hidratação não diferem, sendo as diferenças os crioprotetores e a curva de congelação (VAJTA e KUWAYAMA, 2006).

Para sobreviver à criopreservação, os embriões devem passar inicialmente por uma solução com 10% ou mais de crioprotetor, para ocorrer desidratação celular e entrada de crioprotetor nas células, e para o retorno da função devem ser descongelados a taxas compatíveis com as de congelação, para que o crioprotetor seja removido e as células reidratadas. A escolha da técnica de adição e remoção do crioprotetor, e taxas de congelação e descongelação adequadas, devem levar em conta a espécie trabalhada, devido às diferenças entre tamanhos e composição de membrana celular (LEIBO, 2008).

Os crioprotetores são divididos em duas categorias, intracelulares ou penetrantes e extracelulares ou não penetrantes. Na primeira categoria tem-se o glicerol, com peso molecular (PM) 92,1, etilenoglicol (PM = 62,1), dimetilsulfóxido (DMSO) (PM = 78,2), propilenoglicol (PM = 76,1), metanol (PM = 32) e propanodiol (NIEMANN, 1991), e na segunda categoria estão a sacarose, glicose e trealose (CROWE, 1983).

Os crioprotetores intracelulares têm elevada ação hidrofílica, por outro lado os extracelulares formam uma viscosa camada na superfície celular causando um efluxo de água e impedindo a formação de cristais de gelo no interior do embrião (Hubalék, 2003).

De acordo com Leibo (2008), frequentemente as taxas de resfriamento são descritas de maneira qualitativa como lenta, moderada, rápida ou mesmo ultrarápida, mas como exercem profundo efeito na formação e crescimento dos cristais de gelo, as taxas de resfriamento deveriam ser expressas quantitativamente. Em taxas de resfriamento lentas o gelo cresce lentamente formando grandes cristais, e sequestra o soluto dissolvido para canais entre os cristais. Em taxas de resfriamento rápidas o gelo cresce mais rapidamente de forma que os cristais formados são muito menores. Portanto, quanto mais lenta a curva mais água é perdida e menos gelo é formado. Em contrapartida, quanto mais rápida a curva menos água se perde, com formação de gelo letal para a célula.

### 2.2.1. Congelação lenta

Os métodos de congelação lenta se desenvolveram a medida que dados relativos a permeabilidade da membrana dos embriões à água e aos crioprotetores em diferentes temperaturas foram disponibilizados. Em 1977, Willadsen, trabalhando com congelação de mórulas de ovinos e bovinos, introduziu mudanças na técnica original descrita por Whittingham em 1971, ou seja, ao invés de uma curva rápida de resfriamento, sugeriu a realização de resfriamento lento. Atualmente os métodos de congelação lenta constam de uma curva de resfriamento lento e controlado, com decréscimo da temperatura de 0,3 a 0,6°C/minuto até atingir -6°C/ -7°C, induzindo ao *seeding* nesta temperatura, com a cristalização do meio. Assim evita-se o aparecimento de grandes cristais de gelo dentro das células, o que causaria danos físicos e morte celular. Posteriormente, em taxas similares de resfriamento, faz-se o decréscimo da curva até a temperatura de -32°C/-35°C. O espaço extracelular é congelado primeiramente e as células são desidratadas gradualmente durante o resfriamento (DINNYES et al., 2006). Existem diferentes protocolos para a congelação lenta, sendo que os mais utilizados envolvem um crioprotetor intracelular ou a associação deste com um extracelular (DOBRINSKY, 2002).

Durante a congelação, um delicado equilíbrio deve ser mantido para evitar danos como a formação de cristais de gelo, choque osmótico, efeitos tóxicos dos crioprotetores, danos por resfriamento, ruptura da zona pelúcida, alterações do citoesqueleto e organelas intracelulares (VAJTA, 2000; PYLES, 2002; DINNYES et al., 2006; VAJTA e KUWAYAMA, 2006). Todos os protocolos são destinados a proteger os embriões contra a formação intracelular de cristais de gelo durante a congelação e a recristalização durante o aquecimento. A fim de evitar a formação de cristais de gelo intracelular, a água intracelular é normalmente substituída pelos crioprotetores permeáveis e os embriões são desidratados pela lenta taxa de resfriamento. A recristalização costuma não ocorrer durante a descongelação por causa da rápida taxa de aquecimento. De acordo com PALASZ e MAPLETOFT (1996), as técnicas “padrões” de congelação lenta existentes permitem o sucesso da criopreservação de embriões de diferentes espécies de animais domésticos.

Durante a congelação lenta, devido às diferenças moleculares e propriedades das membranas celulares, os crioprotetores penetram as células em diferentes



taxas. O estágio de desenvolvimento embrionário também altera a permeabilidade ao crioprotetor. A permeabilidade da célula a água, conhecido como condutividade hidráulica, depende da temperatura de exposição e da diferença na pressão osmótica entre as soluções dentro e fora das células (taxa de pressão de vapor extracelular para intracelular). Quando uma solução é resfriada a temperaturas abaixo de zero grau com formação de gelo, assumindo que não aconteceu super resfriamento, a concentração dos componentes dissolvidos aumenta. Assim, quanto menor a temperatura mais água congela e a solução fica cada vez mais concentrada (LEIBO, 2008).

O glicerol é um dos crioprotetores mais difundidos para a criopreservação de embriões bovinos. Inicialmente os embriões são expostos ao glicerol 10% por 10 minutos a temperatura ambiente. Ao ser envasado o embrião fica na coluna central da palheta separado das colunas externas com o mesmo crioprotetor por duas colunas de ar. No processo de descongelação os embriões são submetidos a soluções com concentrações decrescentes de glicerol associado à solução de sucrose. Este processo ajuda na remoção do crioprotetor do meio intracelular e na reidratação celular. Outro crioprotetor amplamente utilizado é o etilenoglicol (EG) 1,5 M. Neste caso, realiza-se a estabilização dos embriões em EG 1,5M por 10 minutos e no processo de envase o embrião fica na coluna central com o etilenoglicol separado por duas colunas de ar das colunas das extremidades com sacarose. Durante a descongelação a palheta é exposta ao ar por 15 segundos e posteriormente permanece 15 segundos em banho-Maria a 30°C. Após isso, agita-se a palheta e as diferentes colunas se misturam iniciando o processo de remoção do crioprotetor e reidratação celular que é realizado no interior da própria palheta (REICHENBACH et al., 2002).

Nas últimas décadas, vários estudos foram realizados com criopreservação de embriões de camundongos como modelo experimental para posterior extrapolação para outras espécies. Por exemplo, Pantano et al. (2000) testaram o efeito da temperatura de imersão dos embriões no nitrogênio líquido, e não observaram influência desta (- 25°C ou - 30°C) sobre o desenvolvimento *in vitro* de embriões de camundongos pós-descongelação, porém obtiveram melhores resultados com o uso de etilenoglicol em comparação ao propilenoglicol e glicerol. Já *in vivo*, a taxa de nascimento de fetos viáveis pós-transferência foi semelhante

entre o etilenoglicol e o glicerol, ambos com resfriamento até -30°C. Visintin et al. (2000) compararam o efeito da adição de várias concentrações de sacarose e/ou geléia real ao glicerol 10%, nas curvas de resfriamento de 0,3°C ou 0,5°C/minuto, até -24°C ou -32°C, em embriões de camundongos. A avaliação *in vitro* pós-descongelamento e a taxa de nascimento de fetos viáveis pós-transferência dos embriões demonstraram que a adição de sacarose ou de geléia real ao meio de congelamento proporcionou maiores taxas de blastocisto e de fetos viáveis, com imersão a -24°C. Já Mello et al. (2001) observaram melhor desenvolvimento *in vitro* de embriões de camundongos pós-descongelamento com curva de resfriamento a -1,2°C/minuto, quando comparado a -5°C/minuto.

### **2.2.2. Conteúdo lipídico versus criopreservação embrionária**

É de grande interesse para a comunidade científica esclarecer a importância entre o acúmulo de lipídios em embriões e a viabilidade embrionária após o processo de criopreservação (ABE et al., 2004).

Em algumas espécies de mamíferos domésticos, os embriões produzidos *in vivo* possuem fisiologicamente o citoplasma rico em lipídios. Entre estas espécies estão os suínos e os caninos (HAYASHI et al., 1989; ABE et al., 2010).

Já os embriões produzidos *in vitro*, de diversas espécies, como os bovinos, também possuem um maior teor de lipídios intracelular. Porém, o mecanismo de acúmulo bem como a fonte dos lipídios no citoplasma dos blastômeros ainda não estão totalmente esclarecidos (ABE et al., 2004). Todavia, segundo Abe et al. (2002), em embriões produzidos *in vitro*, a maioria dos lipídios é derivada dos triglicerídeos presentes nas lipoproteínas do soro. Este excesso de lipídios já havia sido previamente reportado por Leibo et al. (1993) em cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* em meios suplementados com soro. Mórulas e blastocistos bovinos cultivados em meios suplementados com soro fetal (TCM 199 + 5% de Soro Fetal) são mais escuros e contêm inclusões citoplasmáticas quando comparados com aqueles cultivados em meios sem soro fetal. Além disso, histologicamente embriões cultivados em meio com soro contêm gotículas de lipídios em maior quantidade e maiores do que os cultivados sem soro (ABE et al., 2004).

Estudos comparando embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* demonstraram diferenças morfológicas, no metabolismo e na qualidade quando avaliados o número de células e a viabilidade para congelação. O deslocamento dos lipídios intracelulares por centrifugação causa melhoria do desenvolvimento de embriões *in vitro*, sugerindo que esses são responsáveis pela sensibilidade ao resfriamento e à congelação (ABE et al., 2004).

De acordo com Ferguson e Leese (1999), as fontes de energia para o embrião são o glicogênio e os lipídios. O glicogênio é a forma de armazenamento da glicose, que é uma importante fonte de energia metabólica que pode ser facilmente mobilizado quando necessário (VOET e VOET, 2006). Já os lipídios são componentes da membrana celular e do citoplasma e desempenham um importante papel como fonte de energia necessária para o desenvolvimento embrionário (ROMEK et al., 2008).

O citoplasma do embrião canino produzido *in vivo* é particularmente rico em lipídios (LEE et al., 2006; ABE et al., 2010; CHASTANT-MAILLARD et al., 2010), e até o momento dados sobre a criopreservação e transferência de embriões criopreservados são escassos.

Kim et al. (2002) congelaram embriões caninos nos estádios de mórula e blastocisto por congelação lenta, e realizaram a transferência de 17 embriões pós-descongelação para três receptoras, sendo oito mórulas, um blastocisto e oito gástrulas, das quais não se obteve nenhum nascimento.

Em trabalho recentemente publicado por Abe et al. (2010), 474 embriões caninos, desde o estágio de 1 célula até blastocisto, foram vitrificados com uso de etilenoglicol, em *cryotop*. Após o aquecimento, 77 embriões foram transferidos não-cirurgicamente para nove cadelas receptoras, numa média de 2 a 4 embriões por cadela, das quais cinco (55%) ficaram gestantes, mas apenas quatro (44%) pariram um total de sete (9,1%) filhotes. Apesar da baixa taxa de natalidade, os autores sugeriram ser a vitrificação um método adequado para criopreservação de embriões caninos, os quais segundo os autores possuem mais lipídios intracitoplasmáticos que suínos e bovinos.

Segundo Tominaga et al. (2000) e Vajta (2000), embriões com menor teor lipídico são resistentes a criopreservação, mas o mesmo não acontece com aqueles com maior teor lipídico, e esses se apresentam mais densos e escuros.

Diferentemente de embriões de ratas, por exemplo, que são de fácil criopreservação, embriões suínos e caninos, com alto teor lipídico, ainda demandam estudos (VAJTA, 2000; ABE et al., 2010; CHASTANT-MAILLARD et al., 2010).

### **2.2.3. Avaliação *in vitro* de embriões criopreservados**

A morte celular é um evento comum em embriões frescos e criopreservados, e as taxas de sobrevivência embrionária são reguladas por fatores do próprio embrião, do sistema reprodutor feminino, bem como das condições de cultivo *in vitro*. Estudos também têm demonstrado o papel de genes ligados a apoptose na morte celular. O papel da morte celular no desenvolvimento embrionário é desconhecido, mas poderia envolver a eliminação de células anormais ou com potencial de desenvolvimento inadequado. Interessantemente, como demonstrado por Hardy (1997) em embriões de camundongos, parece que o grau de morte celular está correlacionado com o número de células no embrião, já que quanto mais células, menor a proporção de células mortas. O estudo da viabilidade celular após a descongelação embrionária é uma forma de se avaliar *in vitro* os métodos de criopreservação. Dentre as técnicas para avaliação *in vitro* pós-descongelação de embriões criopreservados, tem-se a microscopia de luz, microscopia eletrônica, microscopia confocal, técnica do TUNEL, avaliação do desenvolvimento embrionário *in vitro*, avaliando a evolução entre diferentes estádios de desenvolvimento, a avaliação da taxa de reexpansão da blastocela, o uso de corantes fluorescentes, os quais coram células vivas e mortas (HARDY, 1997). De acordo com este autor, o uso de corantes fluorescentes apresenta a superioridade sobre as técnicas de microscopia por permitir a avaliação da totalidade de células embrionárias.

Estudos de microscopia de luz e eletrônica demonstraram que células embrionárias criopreservadas apresentam fragmentação nuclear e citoplasmática, condensação da cromatina e perda da membrana nuclear (HURST et al., 1978; ENDERS et al., 1982; HARDY et al., 1989). Entretanto, segundo Hardy (1997), poucas células podem ser avaliadas por estas técnicas.

Shu et al. (2009) avaliaram a velocidade de reexpansão da blastocela pós-descongelação de embriões humanos criopreservados. Os autores observaram que

49% dos embriões apresentaram uma rápida reexpansão após 2 a 4 horas do início do cultivo embrionário *in vitro*, e apenas três gestações foram estabelecidas a partir de 42 transferências de 63 blastocistos sem reexpansão da blastocele. A taxa de reexpansão também foi o critério utilizado por Nicola et al. (1999) para avaliação da viabilidade de embriões suínos criopreservados com etilenoglicol e glicerol, porém estes autores afirmaram que este é um critério subjetivo de avaliação, sendo necessários métodos alternativos.

Pryor et al. (2011) associaram os corantes iodeto de propídeo (IP) e Hoechst 33342 para estimar a quantidade de células vivas e mortas em embriões bovinos produzidos *in vitro*. As células mortas são permeáveis ao IP e se coram em vermelho ou laranja, já as células vivas possuem membrana celular intacta e se coram pelo Hoechst em azul. Este método permite uma boa estimativa da porcentagem de células vivas e mortas, contudo pode haver uma subestimativa das células mortas se estas estiverem circundadas por células vivas impedindo que o IP penetre nas células.

É escassa na literatura informações sobre a utilização do Hoeschst e IP na avaliação de embriões caninos. Apenas recentemente Abe et al. (2010) utilizaram o IP para avaliar a viabilidade celular pós-aquecimento de embriões caninos vitrificados. Os autores consideraram viáveis aqueles embriões com 75% ou mais de blastômeros não corados pelo IP, e obtiveram 50% e 40% de viabilidade para mórulas e blastocistos, respectivamente, mas interessantemente mais de 80% de viabilidade para embriões em estádios mais jovens, sugerindo haver diferenças na sensibilidade à criopreservação em embriões caninos em diferentes estádios de desenvolvimento. Não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem a reexpansão *in vitro* de blastocele em embriões caninos criopreservados.

### **3. Capítulo 1 – Viabilidade *in vitro* de blastocistos caninos criopreservados por congelação lenta**

Carlos Renato de Freitas Guaitolini<sup>1,2</sup>, Marilda Onghero Taffarel<sup>1,2</sup>, Natália Soares Teixeira<sup>1</sup>, Mateus José Sudano<sup>2</sup>, Maria Denise Lopes<sup>2</sup>, Fernanda da Cruz Landin-Alvarenga<sup>2</sup>, Cláudio Alvarenga de Oliveira<sup>3</sup>, Marcelo Rezende Luz<sup>1</sup>

Artigo submetido à publicação na revista Theriogenology.

## **Viabilidade *in vitro* de blastocistos caninos criopreservados por congelação lenta**

Carlos Renato de Freitas Guaitolini<sup>1,2</sup>, Marilda Onghero Taffarel<sup>1,2</sup>, Natália Soares Teixeira<sup>1</sup>, Mateus José Sudano<sup>2</sup>, Maria Denise Lopes<sup>2</sup>, Fernanda da Cruz Landin-Alvarenga<sup>2</sup>, Cláudio Alvarenga de Oliveira<sup>3</sup>, Marcelo Rezende Luz<sup>1</sup>

1 – Laboratório de Reprodução Animal – Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Departamento de Medicina Veterinária – Campus de Alegre, Alto Universitário s/n, Caixa Postal 16, Alegre ES, Brasil, 29500-000.

2 – Universidade Estadual Paulista - UNESP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Rubião Jr. s/n, Botucatu SP, Brasil, 18618-970.

3 – Laboratório de Dosagens Hormonais, Universidade de São Paulo – USP, Departamento de Reprodução Animal - São Paulo SP, Brasil, 05508-270.

### **Resumo**

A criopreservação de embriões caninos ainda é um desafio para a comunidade científica. Objetivou-se com este estudo avaliar a taxa de reexpansão da blastocele, a viabilidade embrionária pós-descongelação, e o desenvolvimento *in vitro* por até 6 dias de blastocistos caninos criopreservados em glicerol 10% e etilenoglicol 1,5M, por congelação lenta. Cinquenta e um blastocistos foram divididos aleatoriamente em dois grupos, GLI (n=26) e EG (n=25). Cada grupo foi subdividido em três: M0 = avaliação imediatamente após a descongelação, GLI = 9 e EG = 9; M3 = avaliação três dias após a descongelação e cultivo *in vitro*, GLI = 8 e EG = 8; e M6 = avaliação seis dias após a descongelação e cultivo *in vitro*, GLI = 9 e EG = 8. Imediatamente após a descongelação, os embriões do M0 foram corados com a associação das sondas fluorescentes iodeto de propídeo (125 µg/ml) e Hoechst 33342 (1mg/ml) para avaliação da viabilidade celular; os embriões do M3 e M6 foram descongelados, cultivados *in vitro* em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar a uma temperatura de 38,5°C, em meio SOFaa acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), por três e seis dias, respectivamente, e corados de forma similar. A taxa de reexpansão da blastocele após 24h de cultivo *in vitro* não diferiu (P = 0,6196) entre os grupos GLI (76,5%) e EG (68,8%), respectivamente. As taxas de viabilidade embrionária pós-

descongelamento dos grupos GLI e EG foram de  $60,6\pm 9,7$  e  $64,4\pm 9,9$ , respectivamente, e não diferiram ( $P = 0,8275$ ). Além disso, não foi verificada diferença ( $P = 0,3105$ ) na viabilidade embrionária entre os momentos M0 ( $61,1\pm 11,6\%$ ), M3 ( $50,0\pm 12,4\%$ ) e M6 ( $76,4\pm 12,0\%$ ). Concluiu-se que blastocistos caninos criopreservados em glicerol 10% ou etilenoglicol 1,5M, por congelamento lento, apresentam taxas de reexpansão da blastocoele satisfatórias, viabilidade in vitro pós-descongelamento similar, e mantêm-se viáveis por até seis dias em cultivo in vitro.

**Palavras-chave:** criopreservação, reexpansão da blastocoele, glicerol, etilenoglicol, viabilidade embrionária, cadela.

### **Abstract**

Canine embryo cryopreservation is still a challenge for the scientific community. The aim of this study was to evaluate the blastocoele re-expansion rates, post-thawing embryonic viability and the in vitro development of canine blastocysts cryopreserved in glycerol 10% and ethylene glycol 1.5M, up to 6 days, by slow freezing. Fifty-one blastocysts were randomly divided into two groups, GLY (n=26) and EG (n=25). Each group was subdivided into three subgroups: M0 = embryonic evaluation immediately after thawing, GLY = 9 and EG = 9; M3 = embryonic evaluation three days after thawing and in vitro culture, GLY = 8 and EG = 8; and M6 = embryonic evaluation six days after thawing and in vitro culture, GLY = 9 and EG = 8. Immediately after thawing, embryos from M0 were stained with the association of the probes propidium iodide ( $125\mu\text{g/ml}$ ) and Hoechst 33342 ( $1\text{mg/ml}$ ) for cellular viability evaluation; embryos from M3 and M6 were thawed and transferred to synthetic oviduct fluid (SOF) + 10% FCS. Dishes were incubated at  $38.5^\circ\text{C}$  under an atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  with maximum humidity, for three and six days, respectively, and similarly stained. Blastocoele re-expansion rates after 24h of in vitro culture did not differ ( $P = 0.6196$ ) between groups GLY (76.5%) and EG (68.8%), respectively. Post-thawing embryonic viability rates were  $60.6\pm 9.7$  and  $64.4\pm 9.9$  for GLY and EG, respectively, without significant difference ( $P = 0.8275$ ). In addition, there was no significant difference among moments M0 ( $61.1\pm 11.6\%$ ), M3 ( $50.0\pm 12.4\%$ ) and M6 ( $76.4\pm 12.0\%$ ) for embryonic viability. The present study indicates that canine blastocysts cryopreserved in glycerol 10% or ethylene glycol 1.5M by slow freezing present satisfactory blastocoele re-expansion rates, similar post-thawing viability, and remain viable for up to six days on in vitro culture.



**Key words:** cryopreservation, blastocoele re-expansion, glycerol, ethylene glycol, embryonic viability, bitch.

## **Introdução**

A importância dos animais de estimação na sociedade bem como as preocupações para a preservação de espécies ameaçadas de extinção tem impulsionado a utilização de cães como modelo experimental. O cão pode ser um modelo experimental mais relevante do que camundongos, devido ao seu tamanho, tempo e modo de vida, e fisiologia semelhante na reatividade a drogas e irradiação, quando comparado à espécie humana [1]. De quase 400 doenças hereditárias conhecidas no cão, mais de 50% destas possuem um equivalente na espécie humana, tais como as cardiomiopatias, distrofia muscular e câncer de próstata [2]. Além disso, técnicas de manipulação de gametas, cultivo embrionário e criopreservação de embriões, utilizando o cão como modelo experimental, podem levar ao desenvolvimento de técnicas que permitam preservar importante material genético de outros canídeos [3].

Na última década foram alcançados muitos avanços com a pesquisa básica e aplicada com maturação do oócitos, fertilização *in vitro*, transferência de embriões, clonagem e tecnologias envolvendo células-tronco embrionárias em canídeos [4]. Todavia, são escassos na literatura dados sobre viabilidade *in vivo* ou *in vitro* de embriões caninos criopreservados.

A avaliação da viabilidade de embriões pós-descongelamento pode ser realizada pela avaliação da reexpansão da blastocoele, clivagem embrionária e eclosão em cultivo *in vitro* [5,6], bem como com a utilização de sondas fluorescentes, como o Hoechst 33342 e o iodeto de propídeo, que coram células vivas e mortas, respectivamente, sendo um bom método para estimar a quantidade de células embrionárias viáveis [6,7]. Em cadelas, Abe et al. [8] avaliaram a viabilidade de embriões vitrificados com uso do iodeto de propídeo, e obtiveram 50% de mórulas e 40% de blastocistos viáveis após o aquecimento.

Objetivou-se com este estudo avaliar a taxa de reexpansão da blastocoele, a viabilidade embrionária *in vitro* pós-descongelamento, e o desenvolvimento *in vitro* por até seis dias de embriões caninos criopreservados em glicerol 10% e etilenoglicol 1,5M.

## Material e Métodos

### Delineamento experimental

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Espírito Santo, sob protocolo 035/2010. Em um arranjo fatorial 2x3, dois tipos de crioprotetores (glicerol 10% e etilenoglicol 1,5M) e três momentos de avaliação da viabilidade embrionária após a descongelação (M0, M3 e M6) foram testados.

### Animais e embriões

Foram utilizados 51 embriões produzidos *in vivo*, colhidos de 16 cadelas hípidas, de diversas raças ou sem-raça-definida, com peso entre cinco e 20 kg, e idade entre um e cinco anos. As cadelas foram detectadas em proestro pela presença de edema vulvar, secreção vaginal sero-sanguinolenta, ou ambas. A partir daí, foram monitoradas por exames de citologia vaginal [9], a cada 48 horas, até a detecção de 80-90% de células superficiais (estro citológico). As cadelas sexualmente receptivas foram acasaladas e aquelas que atingiram o estro citológico mas não estavam sexualmente receptivas foram inseminadas artificialmente, a cada 48h, por três vezes. Um macho fértil (> 300 milhões de espermatozoides viáveis móveis) foi utilizado para as cópulas ou inseminações artificiais.

Os embriões foram divididos aleatoriamente em dois grupos, GLI (n=26) e EG (n=25). Cada grupo foi subdividido em três (M0 = avaliação imediatamente após a descongelação, GLI = 9 e EG = 9; M3 = avaliação três dias após a descongelação e cultivo *in vitro* GLI = 8 e EG = 8; e M6 = avaliação seis dias após a descongelação e cultivo *in vitro*, GLI = 9 e EG = 8).

### Colheita dos embriões

A colheita dos embriões foi realizada por lavagem uterina, pela técnica *ex vivo* descrita por Luz et al. [10], 12 dias (D12) após a primeira cópula ou IA. O protocolo anestésico foi constituído de acepromazina (Acepran 0,2%; Vetnil Ind. Com. de Produtos Veterinários Ltda. Louveira, SP, Brasil) (0,1 mg/ kg IM), tiletamina / zolazepam (Zoletil 50; Virbac Saúde Animal. R. Humberto I, SP, Brasil) (7,5 mg/ kg IM) e propofol (Propovan; Cristália Prod.

Químicos Farm. Ltda. Av. N. S. Assunção, São Paulo, SP, Brasil) (5,0 mg/kg IV). Entretanto, o propofol só foi administrado após a remoção do útero. Suscintamente, as doadoras foram submetidas à ovariosalpingohisterectomia (OSH), e foram realizadas três lavagens em cada corno uterino, com solução salina fosfatada tamponada de Dulbecco's (DPBS) na temperatura de 36 a 37°C, num volume total de 30 ml/corno uterino. O lavado foi drenado diretamente para placas de Petri com solução de DPBS com BSA 0,4% (PBS com BSA 0.4%; Nutricell Nutrientes Celulares, Campinas, SP, Brasil) e realizada a identificação das estruturas embrionárias, as quais foram transferidas para placas de Petri de 35 x 10 mm descartáveis. As estruturas embrionárias foram avaliadas e classificadas quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade [11] em estereomicroscópio, sob aumentos de 10X e 40X. A taxa de recuperação embrionária foi determinada pela divisão do número de embriões obtidos pelo número de corpos lúteos presentes nos ovários da doadora, multiplicado por 100 [10].

### **Congelamento e descongelamento dos embriões**

A criopreservação dos embriões foi realizada pelo método de congelamento lento, em máquina de congelamento programável (TK 3000<sup>®</sup>, TK Tec. Congel. LTDA, Uberaba, MG, Brasil). Blastocistos graus I e II (n=51), foram equilibrados em gotas de 200µL de glicerol a 10% (GLI, n = 26) ou etilenoglicol 1,5 M (EG, n = 25) por 10 minutos. Os embriões foram envasados individualmente em palhetas de 0,25 mL com crioprotetor nas três colunas (grupo GLI) ou crioprotetor entre colunas de sucrose 1,0 M (grupo EG). As palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L) a -6°C, e mantidas nesta temperatura por 2 minutos para equilíbrio. Após o *seeding*, a taxa de resfriamento foi de -0,6°C/min até -35°C, permanecendo nesta temperatura por mais 5 minutos para estabilização, quando as palhetas foram imersas em N<sub>2</sub>L.

Os embriões do grupo GLI foram descongelados pela exposição das palhetas ao ar por 15 segundos e imersão em banho-Maria a 37°C por 15 segundos. O crioprotetor foi removido em três etapas, com banhos de 15 minutos em soluções com concentrações decrescentes de glicerol (6,6%, 3,3% e 0,0%) acrescidas de sucrose 1,0M. Já os embriões do grupo EG foram descongelados da mesma forma, porém sem as três etapas de remoção do crioprotetor.

### **Avaliação da viabilidade embrionária pós-descongelamento**

Cinquenta e um embriões foram avaliados quanto a viabilidade pós-descongelamento. Os embriões do M0 foram descongelados e imediatamente corados com a associação das sondas iodeto de propídeo (IP) e Hoechst 33342 para avaliação da viabilidade celular; os embriões do M3 foram descongelados, cultivados *in vitro* por três dias e corados de forma similar; os embriões do M6 foram descongelados, cultivados *in vitro* como descrito anteriormente, por seis dias, e similarmente corados. Os embriões foram incubados em solução de DPBS com BSA 0,4%, acrescida de 125µg/mL da sonda fluorescente IP (Sigma Chemical CO, St. Louis) durante 30 segundos. Em seguida foram transferidos para uma gota, sobre lâmina histológica, contendo solução de 1mg/mL de Hoechst 33342 (Sigma Chemical CO, St. Louis) e glicerol, sendo cobertos por lamínula e examinados após 15 minutos em microscópio de fluorescência (Leica® DM LB- filtro azul 535 e 617 nm). Os blastômeros que fluoresceram em azul foram considerados viáveis (membrana plasmática íntegra) enquanto aqueles que fluoresceram em vermelho ou rosa foram considerados inviáveis (membrana plasmática lesada). Os embriões foram considerados viáveis quando apresentavam mais que 50% de blastômeros viáveis [5, 12].

Trinta e três embriões (GLI, n = 17; EG, n = 16) foram avaliados quanto a taxa de reexpansão da blastocela após 24h de cultivo *in vitro*, bem como quanto a taxa de eclosão embrionária, avaliada após 3 dias (M3) ou 6 dias (M6) de cultivo *in vitro*.

### **Cultivo *in vitro***

O cultivo *in vitro* foi realizado em estufa com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar a uma temperatura de 38,5°C, em meio SOFaa acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB).

### **Dosagem hormonal**

Amostras de sangue foram colhidas por venopunção da cefálica no dia 0 (D0 – primeira cópula ou inseminação artificial) e dia 12 (D12). O sangue foi imediatamente centrifugado (600 x g por 15 min) e o plasma acondicionado em tubos de polipropileno (-20°C) para posterior dosagem de progesterona (P4), realizada com kits comerciais de

radioimunoensaio em fase sólida (Progesterone Coat- a Count<sup>®</sup>; Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA), previamente validado para plasma canino [13]. As dosagens de P4 foram realizadas após o término de todas as colheitas embrionárias. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 3,16% e a sensibilidade (dose mínima) foi de 94% (0,03ng/mL).

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados por regressão logística, utilizando o processo de logística (PROC LOGISTIC) com o software estatístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). As fontes de variação incluídas no modelo foram tipo de crioprotetor (GLI e EG), momento de avaliação da viabilidade embrionária após a descongelação (M0, M3 e M6) e interação de primeira ordem; todos os fatores foram considerados efeitos fixos. O efeito principal é apresentado na ausência de interações significativas. Foi considerado o nível de significância de 5%.

### **Resultados e Discussão**

Foram recuperadas 72 estruturas embrionárias de 16 cadelas, sendo 51 blastocistos classificados como graus I e II, os quais foram submetidos à criopreservação. As demais estruturas embrionárias identificadas (ovócitos, embriões com poucos blastômeros, mórulas e blastocistos graus III) foram descartadas. No total, 125 corpos lúteos foram identificados nos ovários, perfazendo uma taxa de recuperação embrionária de 57,6%. Interessantemente, foram recuperadas 100% das estruturas embrionárias de sete cadelas (43,7%), entre 50-90% das estruturas embrionárias de três cadelas (18,7%) e em quatro cadelas (25,0%) não foram recuperadas estruturas embrionárias. A taxa de recuperação embrionária deste estudo (57,6%) foi inferior a descrita por Luz et al. [10], com 81,0%. Todavia, esses autores também recuperaram um número maior de blastocistos (59/90) em relação ao número total de estruturas embrionárias recuperadas, com a mesma metodologia do presente estudo. Fatores como hiperplasia cística endometrial [14] ou variação na concentração plasmática de progesterona [10] podem ter afetado a taxa de recuperação embrionária.

A concentração plasmática de P4 no dia da primeira cópula ou IA (D0) foi de  $4,57 \pm 3,77$  ng/mL, e no dia da colheita embrionária (D12) foi de  $28,56 \pm 3,21$  ng/mL. Estes valores

demonstram que as cadelas foram acasaladas no período fértil e que as colheitas embrionárias foram realizadas no início da gestação, com alta concentração de P4, concordando com os valores de P4 descritos para o período fértil da cadela [15] e início da gestação [16].

A taxa (%) de embriões com zona pelúcida rompida imediatamente após a descongelação não diferiu entre os grupos GLI e EG [3/26 (11,5%) versus 2/25 (8,0%), respectivamente;  $P = 0,6726$ ]. Essas taxas foram similares às de Van den Abbeel e Van Steirteghem [12], os quais obtiveram taxas de 2,3% a 16,6% com embriões humanos criopreservados também por congelação lenta. Além disso, lesões de zona pelúcida já foram analisadas e quantificadas em diferentes espécies de mamíferos [17, 18, 19]. Os danos a zona pelúcida de embriões criopreservados podem ocorrer por fatores como taxa de resfriamento e de aquecimento, tipo de crioprotetor [20], estresse osmótico pela adição ou remoção do crioprotetor, formação de bolhas de gás, fraturas celulares [17], e podem afetar negativamente a viabilidade embrionária. A causa das lesões de zona pelúcida encontradas neste experimento não foi objeto de estudo, mas as taxas obtidas podem ser consideradas satisfatórias [12, 18, 19].

A taxa de reexpansão embrionária após 24h de cultivo *in vitro* não diferiu entre os grupos GLI e EG [13/17 (76,5%) versus 11/16 (68,8%), respectivamente,  $P = 0,6196$ ]. Shu et al. [5] obtiveram taxas de reexpansão de 48 e 50% em blastocistos humanos congelados nos dias 5 e 6, respectivamente. Os autores relacionaram a rápida reexpansão da blastocele (2 a 4h de cultivo *in vitro*) com maiores taxas de implantação e gestação, quando comparadas com reexpansão que não ocorre de forma tão rápida. Da mesma forma, estudos com consumo de glucose durante a reexpansão de blastocistos bovinos demonstraram ser a reexpansão um bom marcador morfológico para seleção de bons embriões [21]. Na espécie ovina, Leoni et al. (2002) avaliaram a viabilidade de blastocistos produzidos *in vitro* e vitrificados, obtendo taxas de reexpansão de 55 a 87%, e também consideraram a reexpansão como fator determinante de viabilidade embrionária. Embora não tenham sido encontrados estudos avaliando a taxa de reexpansão de embriões caninos criopreservados, as taxas obtidas neste estudo podem ser consideradas satisfatórias [5, 21, 22].

Surpreendentemente a taxa de eclosão embrionária, nos momentos M3 e M6, para ambos os grupos, foi de 0,0%. Todavia, este resultado foi similar ao obtido por Lindeberg et al. [23], os quais não observaram eclosão em embriões de raposas (*Vulpes vulpes*) cultivados *in vitro* por até 3 semanas. De acordo com Holst e Phemister [24] e Concannon et al. [25], os embriões caninos implantam-se entre os dias 18-21 após a ovulação. A concentração

plasmática de P4 ( $4,57 \pm 3,77$  ng/ml) revelou que as cadelas estavam no período da ovulação (em média 2 dias após o pico de LH) no momento da primeira cópula ou IA, e portanto os embriões estariam com aproximadamente 18 dias ao término do cultivo in vitro de seis dias (M6), mas mesmo assim não foi observada nenhuma eclosão. O processo fisiológico de eclosão embrionária demanda muito do embrião, e uma alta porcentagem de embriões falham em eclodir, ou degeneram rapidamente após a eclosão, e supostamente condições inadequadas de cultivo ou até “fraqueza” do próprio embrião seriam as principais causas [26]. Sabe-se que o meio SOF, utilizado neste estudo, é um meio preconizado para cultivo inicial de oócitos e embriões [27], ou seja, possivelmente a falta de componentes na sua composição pode ter impossibilitado a eclosão in vitro dos embriões.

Os efeitos do GLI e EG na viabilidade embrionária pós-descongelamento dos embriões caninos cultivados in vitro e corados com iodeto de propídeo e Hoechst 33342 são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Viabilidade embrionária (%) pós-descongelamento de embriões caninos criopreservados em glicerol 10% (GLI) ou etilenoglicol 1,5M (EG), e corados com iodeto de propídeo e Hoechst 33342 imediatamente (M0), três dias (M3) ou seis dias (M6) após a descongelamento.

Crioprotetores / Momentos	Taxa de embriões viáveis (%)	P valor
GLI	61,53 (16/26) <sup>a</sup>	0,8275
EG	64,00 (16/25) <sup>a</sup>	
M0	61,10 (11/18) <sup>a</sup>	0,3105
M3	50,00 (08/16) <sup>a</sup>	
M6	76,40 (13/17) <sup>a</sup>	

Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Não foi observado efeito do crioprotetor sobre a viabilidade embrionária pós-descongelamento ( $P = 0,8275$ ). Cocero et al. [28] obtiveram maiores taxas de viabilidade embrionária após criopreservação de embriões ovinos com uso de etilenoglicol, ao invés de glicerol, e sugeriram ser o etilenoglicol mais eficaz. Resultados similares foram obtidos por Pantano et al. [29], com superioridade do etilenoglicol em relação ao propilenoglicol e glicerol na congelamento de embriões murinos. Já Martinez e Matkovic [30] compararam o desenvolvimento embrionário e as taxas de eclosão de embriões ovinos, e não encontraram

diferença estatística entre ambos os crioprotetores. Kim et al. [31] utilizaram o glicerol como crioprotetor para embriões caninos, em congelação lenta, os quais após descongelação foram transferidos para receptoras, sem obtenção de gestação. Entretanto, não foi realizada avaliação *in vitro* da viabilidade embrionária pós-descongelação. Os autores do presente trabalho desconhecem estudos comparando ou avaliando após a descongelação o efeito do glicerol e do etilenoglicol em embriões caninos criopreservados por congelação lenta.

No presente estudo, a avaliação da viabilidade embrionária pós-descongelação com as sondas iodeto de propídeo (IP) e Hoechst 33342 permitiu estimar a porcentagem de blastômeros vivos e mortos (Figura 1). Este método permite uma boa estimativa das células vivas e mortas no embrião, já que as células mortas são permeáveis ao IP e as células vivas coram-se pelo Hoechst. Entretanto, pode ocorrer uma subestimativa das células mortas (permeáveis) ao IP, caso estas estejam circundadas por células vivas (impermeáveis) ao corante [6].

Imediatamente após a descongelação, 39,9% dos embriões do grupo M0 apresentavam-se inváveis, corados pelo IP. Resultado semelhante foi encontrado por Abe et al. [8] que avaliaram a viabilidade de embriões caninos vitrificados, imediatamente após o aquecimento, e obtiveram taxas de 50% para mórulas e 40% para blastocistos. Entretanto, diferentemente deste estudo, em que os embriões foram considerados viáveis quando apresentavam mais que 50% de células não coradas pelo IP, estes autores consideraram um mínimo de 75% de blastômeros viáveis. Como citado anteriormente, fatores como taxa de resfriamento e aquecimento, tipo de crioprotetor, podem causar alterações de membrana plasmática pós-descongelação [17, 20]. Além disso, a presença de grande quantidade de lipídios intracelulares, como no embrião canino [2] pode ter contribuído para a quantidade de células mortas e coradas pelo IP imediatamente após a descongelação. Assim como ocorre na espécie suína [32], possivelmente embriões caninos apresentam maior sensibilidade a criopreservação em função dos lipídeos intracelulares.



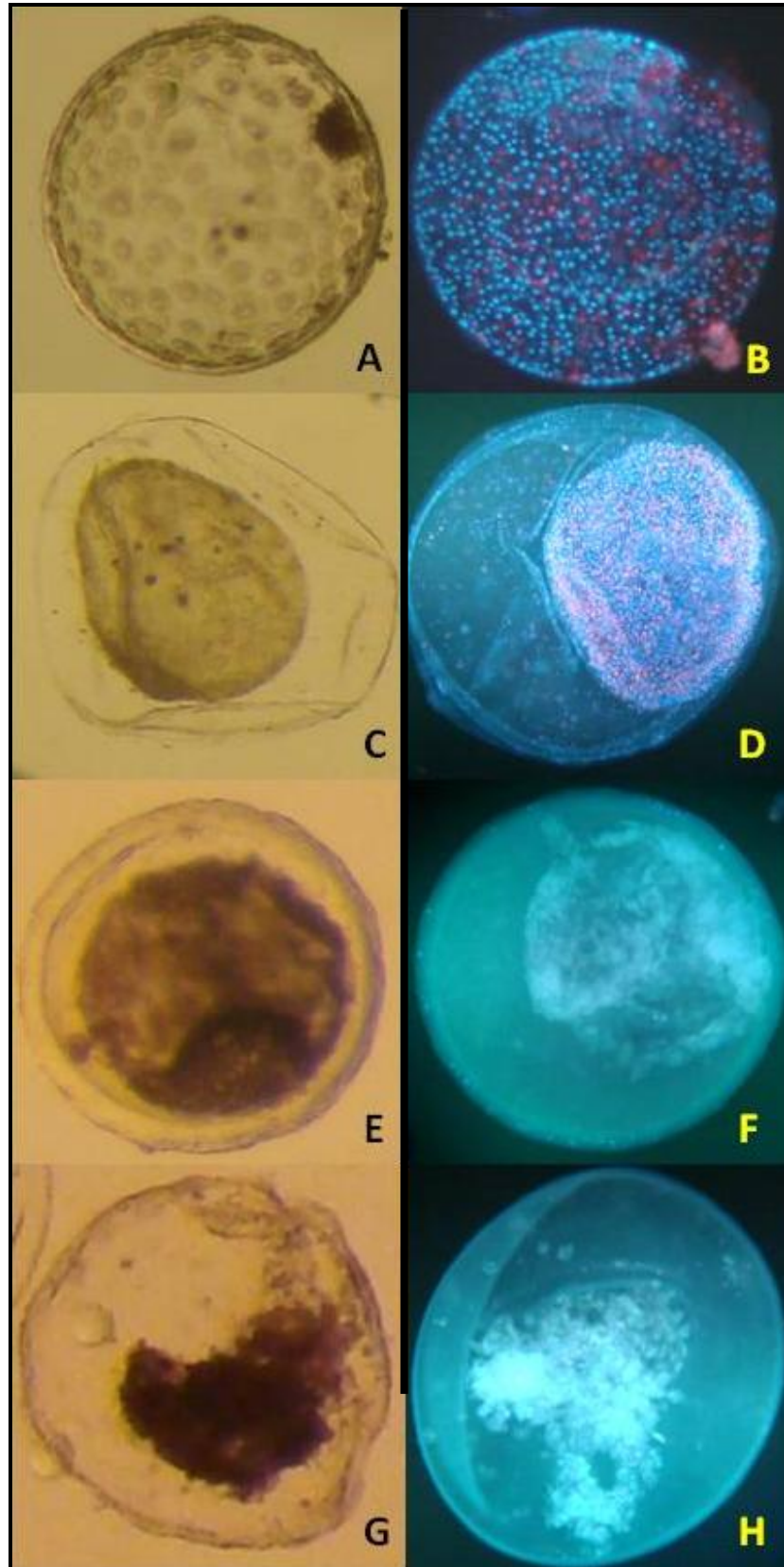


Figura 1 – Aparência morfológica (A,C,E,G) e após coloração pelo Iodeto de Propídeo e Hoechst 33342 (B,D,F,H) de blastocistos caninos a fresco (A,B), imediatamente após a descongelação (C,D), cultivados *in vitro* por 3 (E,F) ou 6 (G,H) dias pós-descongelação. A, C, E e G - aumento de 10X; B, D, F e H – aumento de 400X. Fonte da imagem B - Derussi (2009).

Embora não tenha sido observada diferença estatística, o grupo M6, embriões descongelados e cultivados *in vitro* por 6 dias (144h), apresentou 26,4% a mais de embriões viáveis que o grupo M3. Sabe-se que algumas alterações de membrana plasmática decorrentes da criopreservação parecem ser reversíveis, já que a maioria das células se recuperam em algumas horas (VAJTA et al., 1997; KAIDI et al., 1999). Este fato pode ter contribuído para o resultado satisfatório obtidos ao término do cultivo neste estudo, e possivelmente a multiplicação celular durante o desenvolvimento embrionário melhorou a viabilidade dos embriões. Como relatado por Lindeberg et al. [23], foi observado aumento no número de células em embriões de raposa (*Vulpes vulpes*) cultivados *in vitro* por até 3 semanas.

O cultivo *in vitro* dos embriões no presente estudo foi realizado em meio SOFaa. Sabe-se que a manutenção da viabilidade embrionária *in vitro* pode ser afetada por vários fatores, como o meio de cultivo, idade da doadora, tamanho do folículo ovariano, fase do ciclo estral e mesmo a adição de suplementos como hormônios, fatores de crescimento [27]. Embora Lindeberg et al.[23] tenha utilizado com sucesso o meio TCM199 para o cultivo *in vitro* de embriões de raposa, um outro canídeo, segundo Hewitt e England [35] não há diferença entre o SOF e o TCM199 para o cultivo de oócitos caninos. Dessa forma, além de oócitos, o meio SOFaa mostrou-se propício também para o cultivo *in vitro* de embriões desta espécie, embora sem eclosão embrionária.

Conclui-se que blastocistos caninos criopreservados em glicerol 10% ou etilenoglicol 1,5M, por congelação lenta, apresentam satisfatória taxa de reexpansão dablastocele, viabilidade *in vitro* pós-descongelação similar e mantêm-se viáveis por até seis dias em cultivo *in vitro*.

## Agradecimentos

A FAPES pelo financiamento concedido (EDITAL – FAPES/MCT/CNPq/CT-INFRA N. 019/2006). A CAPES-REUNI pela concessão da bolsa de estudo. A Dra. Ana Augusta Pagnano Derussi pela imagem do embrião canino a fresco corado *in vivo* pelo iodeto de propídeo e Hoechst 33342.

## Referências

- [1].SCHNEIDER, M. R.; WOLF, E.; KOLB, H. J.; ADLER, H. Canine embryo-derived stem cells and models for human diseases. **Human Molecular Genetics**, v.17, p.42-47, 2008.
- [2]. CHASTANT-MAILLARD, S.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; SAINT-DIZIER, M.; CHODKIEWICZ, M.; REYNAUD, K. Embryo biotechnolgy in dog: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p. 1049-1056, 2010.
- [3].HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Manipulation of canine fertility using *in vitro* culture techniques. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.57, p.111-125, 2001.
- [4].JANG, G.; HONG, S. G.; OHE, H. J.; KIM, M. K.; PARK, J. E.; KIM, H. J.; KIM, D. Y.; LEE, B. C. A cloned toy poodle produced from somatic cells derived from an aged female dog. **Theriogenology**, v.69, p.556-563, 2008.
- [5].SHU, Y.; WATT, J.; GEBHARDT, J.; DASIG, J.; APPLING, J.; BEHR, B. The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. **Fertility and Sterility**, v.91, n.2, 2009.
- [6].PRYOR, J. H.; LOONEYA, C. R.; ROMOB, S.; KRAEMER, D. C.; LONGC, C. R. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. **Theriogenology**, v.75, p.24-33, 2011.
- [7].LATT, S. A.; STETTEN, G. Spectral studies on Hoechst 33258 and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribo- nucleic acid synthesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.24, p. 24-33, 1976.
- [8].ABE, Y.; SUWA, Y.; TOMOYOSHI, A.; UETA Y. Y.; KOBAYASHI, N.; OHSHIMA, N.; SHIRASUNA, S.; ABDEL-GHANI, M. A.; OI, M.; KOBAYASHI, Y.; MIYOSHI, M.; MIYAHARA, K.; SUZUKI, H. Cryopreservation of canine embryos. **Biology of Reproduction**, 2010. Doi:10.1095/biolreprod.110.087312.

- [9]. CONCANNON, P. W.; DIGREGORIO, G. B. Canine vaginal cytology. In: BURKE, T.J. **Small animal reproduction and fertility**. Philadelphia: Lea&Febiger, 1986. p.96-111.
- [10]. LUZ, M. R.; HOLANDA, C. C.; PEREIRA, J. J.; FREITAS, P. M. C.; SALGADO, A. E. P.; DI GIORGIO GIANNOTTI, J.; DE OLIVEIRA, S. B.; TEIXEIRA, N. S.; DE FREITAS GUAITOLINI, C. R. High embryonic recovery rates with *in vivo* and *ex vivo* techniques in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, 2010. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01693.x.
- [11]. STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3 ed. Illinois: **Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões**, 1999.
- [12]. VAN DEN ABBEEL, E.; VAN STEIRTEGHEM, A. Zona pellucida damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and *in vitro* viability. **Human Reproduction**, v.15, p.373-378, 2000.
- [13]. SRIKANDAKUMAR, A.; INGRAHAM, R. H.; ELLSWORTH, M.; ARCHBALD, L. F.; LIAO, A.; GODKE, R. A. Comparison of a solid-phase, no-extraction radio-immunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch, and cow. **Theriogenology**, v.26, p.779-793, 1986.
- [14]. TSUTSUI, T.; HORI, T.; OKAZAKI, H.; TANAKA, A.; SHIONO, M.; YOKOSUKA, M.; KAWAKAMI, E. Transfer of canine embryos at various development stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, p.401-405, 2001.
- [15]. CONCANNON, P. W.; HANSEL, W.; MCENTEE, K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with pre-ovulatory luteinization in the bitch. **Biology of Reproduction**, v.17, p. 604-613, 1977.
- [16]. LUZ, M. R.; BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; LOPES, M. D. Plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F<sub>2</sub>-alpha (PGFM), progesterone and estradiol in pregnant and nonpregnant diestrus cross-bred bitches. **Theriogenology**, v.66, p.1436-1441, 2006.
- [17]. LEIBO, S.; McGRATH, J.; CARVALHO, E. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilised mouse ova as a function of cooling rate. **Cryobiology**, v.15, p. 257-271, 1978.

- [18]. SCHIEWE, M. C.; RALL, W. F.; STUART, L. D.; WILDT, D. E. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. **Theriogenology**, v.36, p.279-293, 1991.
- [19]. KASAI, M.; ZHU, S. E.; PEDRO, P. B.; NAKAMURA, K.; SAKURAI, T.; EDASHIGE, K. Fracture damage of embryos and prevention during vitrification and warming. **Cryobiology**, v.33, p.459-464, 1996.
- [20]. COHEN, J.; DEVANE, G. W.; ELSNER, C. W.; FEHILLY, C. B.; KORT, H. I.; MASSEY, J. B.; TURNER JR. T. G. Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. **Fertility and Sterility**, v.49, p.283-289, 1988.
- [21]. GARDNER, D. K.; PAWELCZYNSKI, M.; TROUNSON, A. O. Nutrient uptake and utilization can be used to select viable day 7 bovine blastocysts after cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v.44, p.472-475, 1996.
- [22]. LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; BERLINGUER, F.; ROSATI, I.; PINTUS, P. P.; LEDDA, S.; NAITANA, S. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. **Cryobiology**, v.45, p. 204-212, 2002.
- [23]. LINDEBERG, H.; JALKANEN, L.; SAVOLAINEN, R. *In vitro* culture of silver fox embryos. **Theriogenology**, v.40, p.779-788, 1993.
- [24]. HOLST, P. A.; PHEMISTER, R. D. The prenatal development of the dog: preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v.5, p.194-206, 1971.
- [25]. CONCANNON, P. W.; TSUTSUI, T.; SHILLE, V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.57, p.169-179, 2001.
- [26]. BRANDÃO, D.O.; MADDOX-HYTTEL, P.; LOVENDAHL, P.; RUMPF, R.; STRINGFELLOW, D.; CALLESEN, H. Post hatching development: a novel system for extended in vitro culture of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 2048-2055, 2004.
- [27]. SONGSASEN, N.; WILDT, D. E. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.2-22, 2007.
- [28]. 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.

- [29]. PANTANO, T.; MELLO, M. R. B.; GARCIA, J. F.; HO, L. L.; VISINTIN, J. A. Efeitos do crioprotetor e da temperatura de imersão em nitrogênio líquido sobre o desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* de mórulas de camundongos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, 2000.
- [30]. MARTINEZ, A. G.; MATKOVIC, M. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. **Theriogenology**, v.49, p.1039-1049, 1998.
- [31]. KIM, Y. J.; KIM, B. J.; YOU, I. J. Embryo transfer with frozen embryos in the dog. **The Korean Society of Veterinary Clinics**, v.19, p.73-79, 2002.
- [32]. HAYASHI, S.; KOBAYASHI, K.; MIZUNO, J.; SAITOH, K.; HIRANO S. Birth of piglets from frozen embryos. **Veterinary Record**, v.125, p. 43-44, 1989.
- [33]. DERUSSI, A. A. P. Efeitos da aplicação do benzoato de estradiol na prevenção da gestação em cadelas. 2009. 99p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.
- [34]. VAJTA, G.; HYTTTEL, P.; CALLESEN, H. Morphological changes of *in vitro* produced bovine blastocysts after vitrification, *in-straw* direct rehydration, and culture. **Molecular Reproduction**, v.48, p.9-17, 1997.
- [35]. KAIDI, S.; BERNARD, S.; LAMBERT, P.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1127-1134, 2001.
- [36]. HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.55, p.63-75, 1999.

## 4. Conclusões Gerais

Com os resultados do presente estudo pode-se concluir que:

- A taxa de reexpansão da blastocle pode ser utilizada como indicativo de viabilidade para embriões caninos criopreservados;
- A não eclosão dos embriões cultivados *in vitro* pode ter ocorrido por falta de nutrientes e/ou outros componentes no meio SOFaa;
- Os crioprotetores glicerol 10% e etilenoglicol 1,5M têm eficiência semelhante na criopreservação de blastocistos caninos por congelação lenta;
- A utilização das sondas fluorescentes iodeto de propídeo e Hoechst 33342 permite a avaliação da viabilidade embrionária pós-descongelação e cultivo *in vitro* em embriões caninos;
- O meio de cultivo SOFaa propicia o cultivo *in vitro* de embriões caninos, porém sem eclosão;
- A criopreservação de embriões caninos por congelação lenta, com os crioprotetores e curvas utilizadas, é um método eficaz para a espécie.

## Referências

ABE, H.; SHIKU, H.; AOYAGI, S.; HOSHI, H. *In vitro* culture and evaluation of embryos for production of high quality bovine embryos. **Journal of Mammalian Ova Research**, v. 21, p. 22-30, 2004.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.57-66, 2002.

ABE, Y.; SUWA, Y.; TOMOYOSHI, A.; UETA Y. Y.; KOBAYASHI, N.; OHSHIMA, N.; SHIRASUNA, S.; ABDEL-GHANI, M. A.; OI, M.; KOBAYASHI, Y.; MIYOSHI, M.; MIYAHARA, K.; SUZUKI, H. Cryopreservation of canine embryos. **Biology of Reproduction**, 2010. Doi:10.1095/biolreprod.110.087312.

CHASTANT-MAILLARD, S.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; SAINT-DIZIER, M.; CHODKIEWICZ, M.; REYNAUD, K. Embryo biotechnology in dog: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p. 1049-1056, 2010.

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.

COHEN, J.; DEVANE, G. W.; ELSNER, C. W.; FEHILLY, C. B.; KORT, H. I.; MASSEY, J. B.; TURNER JR. T. G. Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. **Fertility and Sterility**, v.49, p.283-289, 1988.

CONCANNON, P. W.; TSUTSUI, T.; SHILLE, V. Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.57, p.169-179, 2001.



CONCANNON, P. W.; HANSEL, W.; MCENTEE, K. Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with pre-ovulatory luteinization in the bitch. **Biology of Reproduction**, v.17, p. 604-613, 1977.

CONCANNON, P. W.; DIGREGORIO, G. B. Canine vaginal cytology. In: BURKE, T.J. **Small animal reproduction and fertility**. Philadelphia: Lea&Febiger, 1986. p.96-111.

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

DERUSSI, A. A. P. Efeitos da aplicação do benzoato de estradiol na prevenção da gestação em cadelas. 2009. 99p. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)** - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

DINNYES, A.; MENG, Q.; POLGAR, Z.; BOONKUSOL, D.; SOMFAI, T. Criopreservação de embriões de mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae – Suplemento 1**, v. 34, p. 171-190, 2006.

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

ENDERS, A. C.; HENDRICKX, A. G.; BINKERD, P. E. Abnormal development of blastocysts and blastomeres in the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, v.21, p.353–366, 1982.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, p. 373-378, 1999.

GARDNER, D. K.; PAWELCZYNSKI, M.; TROUNSON, A. O. Nutrient uptake and utilization can be used to select viable day 7 bovine blastocysts after

cryopreservation. **Molecular Reproduction and Development**, v.44, p.472-475, 1996.

HARDY, K. Cell death in the mammalian blastocyst. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.919-925, 1997.

HARDY, K.; HANDYSIDE, A. H.; WINSTON, R. M. L. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. **Development**, v.107, p.597–604, 1989.

HATOYA, S.; TORII, R.; KONDO, Y.; OKUNO, T.; KOBAYASHI, K.; WIJEWARDANA, V.; KAWATE, N.; TAMADA, H.; SAWADA, T.; KUMAGAI, D.; SUGIURA, K.; INABA, T. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.298–305, 2006.

HAYASHI, S.; KOBAYASHI, K.; MIZUNO, J.; SAITOH, K.; HIRANO S. Birth of piglets from frozen embryos. **Veterinary Record**, v.125, p. 43-44, 1989.

HAYES, B.; FAGERLIE, S. R.; RAMAKRISHNAN, A.; BARA, S.; HARKEY, M.; GRAF, L.; BAR, M.; BENDORAITE, A.; TEWARI, M.; TOROK-STORB, B.; Derivation, characterization, and in vitro differentiation of canine embryonic stem cells. **Stem Cells**, v.26, p.465–473, 2008.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Manipulation of canine fertility using *in vitro* culture techniques. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.57, p.111-125, 2001.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.55, p.63–75, 1999.

HOLST, P. A.; PHEMISTER, R. D. The prenatal development of the dog: preimplantation events. **Biology of Reproduction**, v.5, p.194-206, 1971.

HORN, P. A.; MORRIS, J. C.; NEFF, T.; KIEM, H. P. Stem cell gene transfer efficacy and safety in large animal studies. **Molecular Therapy**, v.10, p.417-431, 2004.

HUBALÉK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.46, p.205-229, 2003.

HURST, P. R.; JEFFERIES, K.; ECKSTEIN, P.; WHEELER, A. G. An ultrastructural study of preimplantation uterine embryos of the rhesus monkey. **Journal of Anatomy**, v.126, p.209-220, 1978.

JALKANEN, I.; LINDEBERG, H. Successful embryo transfer in the silver Fox (*Vulpes vulpes*). **Animal Reproduction Science**, v.54, p.139-147, 1998.

JANG, G.; HONG, S. G.; OHE, H. J.; KIM, M. K.; PARK, J. E.; KIM, H. J.; KIM, D. Y.; LEE, B. C. A cloned toy poodle produced from somatic cells derived from an aged female dog. **Theriogenology**, v.69, p.556-563, 2008.

KAIDI, S.; BERNARD, S.; LAMBERT, P.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1127-1134, 2001.

KASAI, M.; ZHU, S. E.; PEDRO, P. B.; NAKAMURA, K.; SAKURAI, T.; EDASHIGE, K. Fracture damage of embryos and prevention during vitrification and warming. **Cryobiology**, v.33, p.459-464, 1996.

KIM, Y. J.; KIM, B. J.; YOU, I. J. Embryo transfer with frozen embryos in the dog. **The Korean Society of Veterinary Clinics**, v.19, p.73-79, 2002.

KIRK, A. D. Crossing the bridge: large animal models in translational transplantation research. **Immunological Reviews**, v.196, p.176-196, 2003.

LATT, S. A.; STETTEN, G. Spectral studies on Hoechst 33258 and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribo- nucleic acid synthesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.24, p. 24-33, 1976.

LEE, H. S.; YIN, X. J.; KONG, I. K. Sensitivity of canine oocytes to low temperature. **Theriogenology**, v.66, p.1468-1470, 2006.

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

LEIBO, S. P.; POLLARD, J. W.; MARTINO, A. Chilling and freezing sensitivity of "reassembled" *in vitro*-derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.65, 1993.

LEIBO, S. P.; SONGSASEN, N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. **Theriogenology**, v.57, p.303-326, 2002.

LEIBO, S.; McGRATH, J.; CARVALHO, E. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilised mouse ova as a function of cooling rate. **Cryobiology**, v.15, p. 257-271, 1978.

LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; BERLINGUER, F.; ROSATI, I.; PINTUS, P. P.; LEDDA, S.; NAITANA, S. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of *in vitro* derived ovine embryos. **Cryobiology**, v.45, p. 204-212, 2002.

LINDEBERG, H.; JALKANEN, L.; SAVOLAINEN, R. *In vitro* culture of silver fox embryos. **Theriogenology**, v.40, p.779-788,1993.

LUVONI, G.C. Current progress on assisted reproduction in dogs and cats: *in vitro* embryo production. **Reproduction and Nutritional Development**, v.40, p.505-512, 2000.

LUZ, M. R.; HOLANDA, C. C.; PEREIRA, J. J.; FREITAS, P. M. C.; SALGADO, A. E. P.; DI GIORGIO GIANNOTTI, J.; DE OLIVEIRA, S. B.; TEIXEIRA, N. S.; DE FREITAS GUAITOLINI, C. R. High embryonic recovery rates with *in vivo* and *ex vivo* techniques in the bitch. **Reproduction in Domestic Animals**, 2010. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01693.x.

LUZ, M. R.; BERTAN, C. M.; BINELLI, M.; LOPES, M. D. Plasma concentrations of 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F<sub>2</sub>-alpha (PGFM), progesterone and estradiol in pregnant and nonpregnant diestrus cross-bred bitches. **Theriogenology**, v.66, p.1436-1441, 2006.

MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZZO, L.; MOLLO, A.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO, F.; DECAMINADA, M.; PATRUNO M. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. **Research in Veterinary Science**, 2010. Doi:10.1016/j.rvsc.2010.07.024.

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

MATTOS, R. F. M. Resposta Ovariana, qualidade embrionária e retorno à atividade reprodutiva natural em felinos domésticos (*Felis catus*) submetidos a diferentes tratamentos hormonais para indução do estro e ovulação. 2004. 146p. **Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)** – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2004.

MELLO, M. R. B.; QUEIROZ, V. S.; LIMA, A. S.; TAVARES, L. M. T.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. O.; WHEELER, M. B.; VISINTIN, J. A. Criopreservação de mórulas de

camundongos por diferentes métodos: lento, vitrificação e rápido. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, p.160-164, 2001.

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

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

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

PANTANO, T.; MELLO, M. R. B.; GARCIA, J. F.; HO, L. L.; VISINTIN, J. A. Efeitos do crioprotetor e da temperatura de imersão em nitrogênio líquido sobre o desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* de mórulas de camundongos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, 2000.

PLANO DE AÇÃO - PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE MAMÍFEROS CARNÍVOROS DO BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. São Paulo: Ibama, 2004.

PRYOR, J. H.; LOONEYA, C. R.; ROMOB, S.; KRAEMER, D. C.; LONGC, C. R. Cryopreservation of in vitro produced bovine embryos: effects of lipid segregation and post-thaw laser assisted hatching. **Theriogenology**, v.75, p.24-33, 2011.

PYLES, E. S. C. S. Vitrificação de ovócitos bovinos: efeito do método e do estágio de maturação sobre o desenvolvimento embrionário. **Dissertação (mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, p. 99, 2002.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; FILHO, A. S. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In:

GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Ed. Varela – São Paulo, p. 127-178, 2002.

RIBEIRO, A. P. C. Influência do estágio reprodutivo e suplementação do meio de cultivo com progesterona e/ou soro de cadela em estro, nas taxas de maturação *in vitro* de oócitos de fêmeas caninas, **Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária)**. Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Jaboticabal, 2007.

ROMEK, M.; GAJDA, B.; KRZYSZTOFOWIEZ, E.; SMORAG, Z. Lipid content of non-cultured and cultured pig embryo. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.24-32, 2008.

SCHIEWE, M. C.; RALL, W. F.; STUART, L. D.; WILDT, D. E. Analysis of cryoprotectant, cooling rate and *in situ* dilution using conventional freezing or vitrification for cryopreserving sheep embryos. **Theriogenology**, v.36, p.279-293, 1991.

SCHNEIDER, M. R.; WOLF, E.; BRAUN, J.; KOLB, H. J.; ADLER, H. Canine embryonic stem cells: State of the art. **Theriogenology**, v.74, p.492–497, 2010.

SCHNEIDER, M. R.; WOLF, E.; KOLB, H. J.; ADLER, H. Canine embryo-derived stem cells and models for human diseases. **Human Molecular Genetics**, v.17, p.42-47, 2008.

SCHNEIDER, M. R.; ADLER, H.; BRAUN, J.; KIENZLE, B.; WOLF, E.; KOLB, H. J. Canine embryo-derived stem cells – toward clinically relevant animal models for evaluating efficacy and safety of cell therapies. **Stem Cells**, v.25, p.1850-1851, 2007.

SHU, Y.; WATT, J.; GEBHARDT, J.; DASIG, J.; APPLING, J.; BEHR, B. The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. **Fertility and Sterility**, v.91, n.2, 2009.

SONGSASEN, N.; WILDT, D. E. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.2-22, 2007.

SRIKANDAKUMAR, A.; INGRAHAM, R. H.; ELLSWORTH, M.; ARCHBALD, L. F.; LIAO, A.; GODKE, R. A. Comparison of a solid-phase, no-extraction radio-immunoassay for progesterone with an extraction assay for monitoring luteal function in the mare, bitch, and cow. **Theriogenology**, v.26, p.779-793, 1986.

STARKEY, M. P.; SCASE, T. J.; MELLERSH, C. S.; MURPHY, S. Dogs really are man's best friend - Canine genomics has applications in veterinary and human medicine. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v.4, n.2, p.112-128, 2005.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 3 ed. Illinois: **Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões**, 1999.

THIBIER, M. Data retrieval committee statistics of embryo transfer – year 2007: The worldwide activity in farm animals embryo transfer. **Embryo Newsletter**, December, 2008.

TOMINAGA, K.; SHIMIZU, M.; OYAMA, S.; IZAIKE, Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different development stages on post-thaw survival of bovine *in vitro* produced 16-cell embryos. **Theriogenology**, v.53, p.1669-1680, 2000.

TSUTSUI, T.; HORI, T.; OKAZAKI, H.; TANAKA, A.; SHIONO, M.; YOKOSUKA, M.; KAWAKAMI, E. Transfer of canine embryos at various development stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.63, p.401-405, 2001.



VAJTA, G.; HYTTEL, P.; CALLESEN, H. Morphological changes of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification, in-straw direct rehydration, and culture. **Molecular Reproduction**, v.48, p.9-17, 1997.

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

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

VAN DEN ABBEEL, E.; VAN STEIRTEGHEM, A. Zona pellucida damage to human embryos after cryopreservation and the consequences for their blastomere survival and in-vitro viability. **Human Reproduction**, v.15, p.373-378, 2000.

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

VISINTIN, J. A.; GARCIA, J. F.; PANTANO, T.; D'ÁVILA ASSUMPÇÃO, M. E. O. Criopreservação de mórulas de camundongos em glicerol, sacarose e geléia real. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.4, 2000.

VOET, D.; VOET, J. Metabolismo do glicogênio. In:\_\_\_\_\_. Bioquímica. Artmed – São Paulo. 3 ed. p. 626-656, 2006.

WHITTINGHAM, D. G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature**, v.223, p.125-126, 1971.

WILDT, D. E. Reproductive research in conservation biology: priorities and avenues for support. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.20, p.391-395, 1989.

WILLADSEN, S. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In: ELLIOTT K, WHELAN J (eds.), **The Freezing of Mammalian Embryos**. Amsterdam: Elsevier-Excerpta Medica; 1977:175–201.

## Anexo I

### Técnica de congelação dos embriões

A criopreservação dos embriões foi realizada por metodologia convencional utilizada para embriões de mamíferos, pelo método de congelação lenta, em máquina de congelação programável (TK 3000<sup>®</sup>, TK Equipamentos para Reprodução). Os blastocistos classificados como graus I e II foram equilibrados em gotas de 200µL de glicerol a 10% e etilenoglicol 1,5 M, por 10 minutos. Ato contínuo, os embriões foram envasados individualmente em palhetas de 0,25 mL com crioprotetor nas três colunas, quando utilizado o glicerol 10%, e o crioprotetor entre colunas de sacarose quando utilizado etilenoglicol 1,5 M. Após a vedação, as palhetas foram transferidas para a máquina de congelação, onde permaneceram em posição vertical, mergulhadas em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>L) a -6°C, por 2 minutos, quando foi realizada a cristalização (*seeding*) com auxílio de uma pinça hemostática previamente mergulhada em N<sub>2</sub>L. Dois minutos após a cristalização, os embriões foram submetidos a uma curva de resfriamento a 0,6°C/ minuto, até -35°C. Nesta temperatura final permaneceram em equilíbrio por 5 minutos, e foram imersos no N<sub>2</sub>L. As palhetas com os embriões permaneceram armazenadas em botijão criogênico até a descongelação.

## Anexo II

### Técnica de coloração dos embriões

Para a análise da viabilidade embrionária pós-descongelamento, embriões dos grupos M0, M3 e M6 foram incubados em solução de DPBS com 0,4% de BSA, acrescida de 125µg/ml de sonda fluorescente iodeto de propídeo (IP) (Sigma Chemical CO, St. Louis) durante 30 segundos. Em seguida foram transferidos para uma gota, sobre lâmina histológica, contendo solução de 1mg/ml de HOECHST 33342 (Sigma Chemical CO, St. Louis) e glicerol, sendo cobertos por lamínula e examinados após 15 minutos em microscópio de fluorescência (Leica® DM LB- filtro azul 535 e 617 nm). Os blastômeros que fluoresceram em azul foram considerados viáveis (com membrana plasmática íntegra) enquanto aqueles que fluoresceram em vermelho ou rosa foram considerados inviáveis. Embriões com menos de 50% de células vermelhas foram considerados viáveis.

### Anexo III

#### Preparo do meio de cultivo SOFaa

Soluções Estoque	A Solução de Sais	B Solução de Bicarbonato	C Sol. de Piruvato	D Sol. de CaCl <sub>2</sub>	L- Glutamina
Água Milli-Q	9,84ml	10ml	10ml	10ml	10ml
NaCl (1,1M)	0,629g	-	-	-	-
KCl (72mM)	0,0534g	-	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (12mM)	0,0162g	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O (7,4mM)	0,0182g	-	-	-	-
Ácido Lático (53,5µM)	60µl	-	-	-	-
Bicarbonato (250mM)	-	0,210g	-	-	-
<i>Phenol Red</i> (266µM)	-	0,001g	-	-	-
Piruvato (100mM)	-	-	0,110g	-	-
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O (178mM)	-	-	-	0,262g	-
L-Glutamina (200mM)	-	-	-	-	0,2923g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem filtrar individualmente todos os estoques em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C).

Obs: Os estoques A, B e D podem ser estocados por um mês, mas os estoques C e L-Glutamina devem ser preparados semanalmente.

SOF estoque	10ml	20ml
Água Milli-Q	7,8ml	15,6ml
Estoque A	1ml	2ml
Estoque B	1ml	2ml
Estoque D	100µl	200µl
L-Glutamina	10µl	20µl
MEM Essenciais (50X)	100µl	200µl
MEM Não-Essenciais (100X)	100µl	200µl
Antibiótico (anexo 17)	50µl	100µl
Myo-Inositol (2,8mM)	0,005g	0,01g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> -2H <sub>2</sub> O (340µM)	0,001g	0,002g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

<b>SOF final</b>	<b>1ml</b>	<b>5ml</b>
SOF estoque	1ml	5ml
Estoque C	2 $\mu$ l	10 $\mu$ l
Soro Fetal Bovino	25 $\mu$ l	125 $\mu$ l
BSA (5mg/ml)	0,005g	0,025g

Obs: Adicionar o BSA por último, esperar dissolver, filtrar em membrana de 0,22 $\mu$ m e colocar na estufa úmida de CO<sub>2</sub> para equilibrar a temperatura e a atmosfera gasosa.

Adaptado de COSTA, M. Z.; RESENDE, M. V.; WOLF, A.; VANTINI, R. Manual de Procedimentos para a Produção *in vitro* (PIV) de Embriões Bovinos. Faculdade de Ciências Agrária e Veterinária, UNESP, Jaboticabal.

## Apêndice I – Figuras

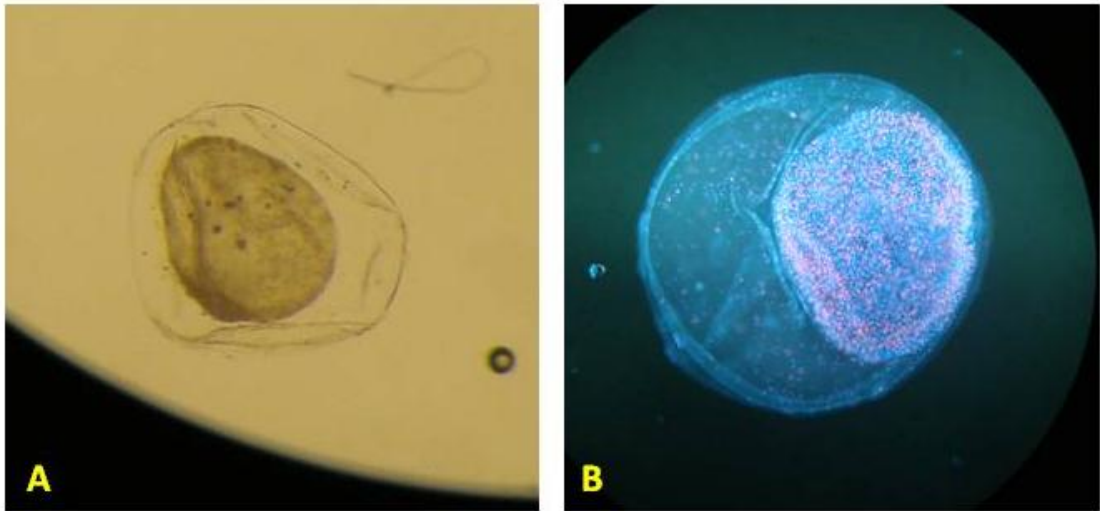


Figura 2 – A – Blastocisto canino criopreservado em glicerol 10% imediatamente após a descongelação (aumento de 10X), B – o mesmo embrião corado com iodeto de propídeo e Hoechst 33342 (aumento de 100X).

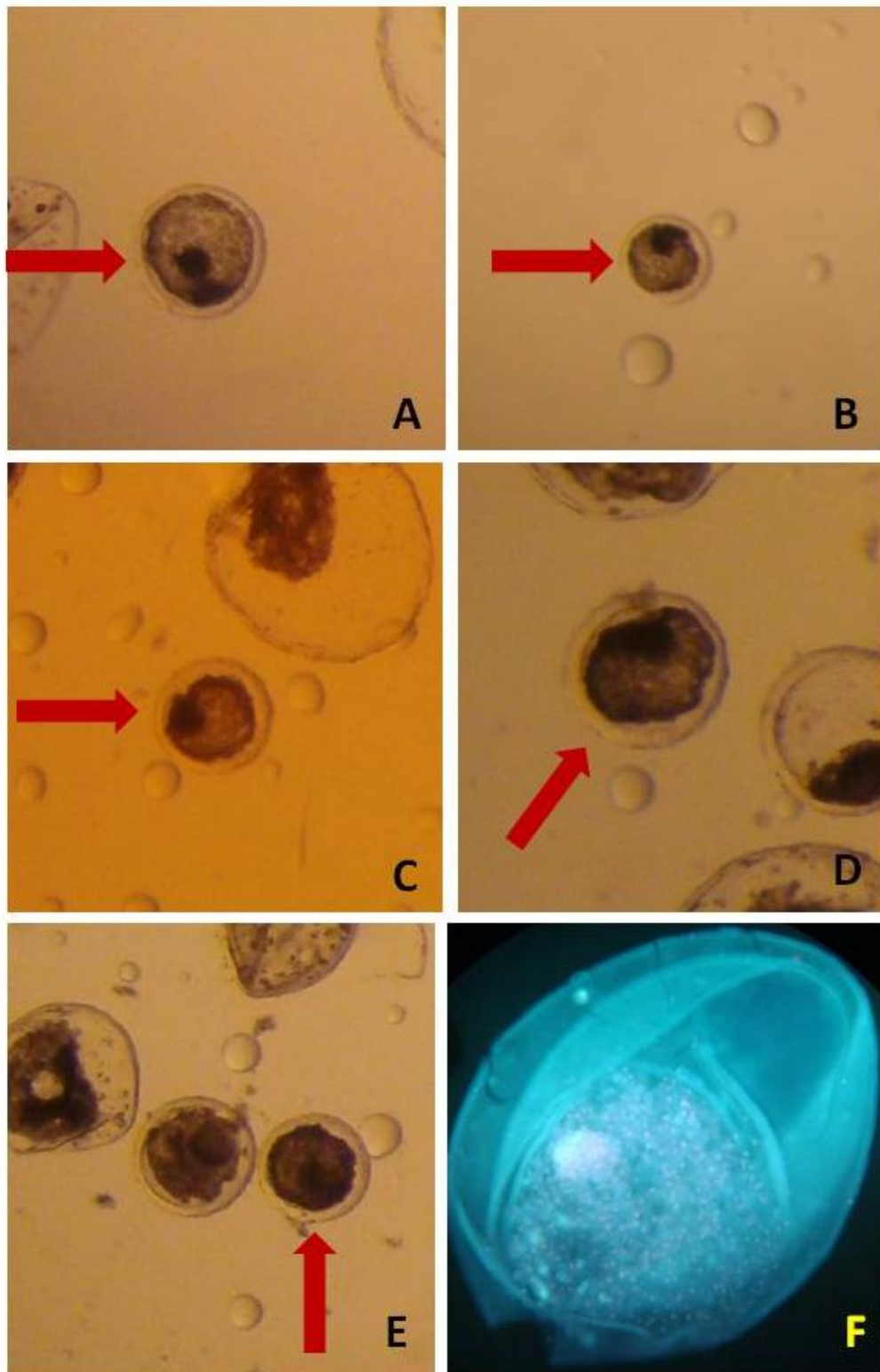


Figura 3 – A - Blastocisto canino criopreservado em etilenoglicol 1,5M (aumento de 10X - seta vermelha) imediatamente após a descongelação; B – 24 horas após (aumento de 10X - seta vermelha); C – 48 horas após (aumento de 10X - seta vermelha); D – 72 horas após (aumento de 10X - seta vermelha) e E – 144 horas após a descongelação (aumento de 10X - seta vermelha); F – o mesmo embrião corado com iodeto de propídeo e Hoechst 33342 (aumento de 100X).



## Apêndice II – Tabela

Tabela 2 – Porcentagem de embriões caninos viáveis pós-descongelamento nos diferentes tratamentos (Glicerol 10% e Etilenoglicol 1,5M), corados com iodeto de propídeo e Hoechst 33342 imediatamente após a descongelamento (M0), após três dias (M3) ou seis dias (M6) de cultivo *in vitro*.

	Glicerol 10%	Etilenoglicol 1,5M
M0	66,67% (6/9)	55,56% (5/9)
M3	37,50% (3/8)	62,50% (5/8)
M6	77,78% (7/9)	75,00% (6/8)
Total	61,54% (16/26)	64,00% (16/25)